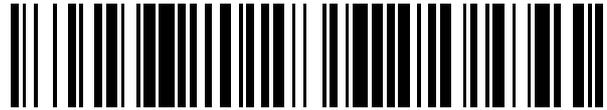


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 675**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2009 E 09793126 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2337851**

54 Título: **Identificación y uso de [2Fe-2S]-dihidroxi-ácido deshidratadas bacterianas**

30 Prioridad:

29.09.2008 US 100792 P

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

13.11.2014

73 Titular/es:

**BUTAMAX ADVANCED BIOFUELS LLC (100.0%)
Route 141 & Henry Clay, DuPont Experimental
Station, Building 356
Wilmington, DE 19880, US**

72 Inventor/es:

**FLINT, DENNIS;
ROTHMAN, STEVEN CARY;
SUH, WONCHUL;
TOMB, JEAN-FRANCOIS y
YE, RICK W.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 521 675 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

Identificación y uso de [2Fe-2S]-dihidroxi-ácido deshidratasa bacterianas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud está relacionada con y reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/100.792 presentada el 29 de septiembre de 2008.

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la microbiología industrial y la expresión de actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa. Más específicamente, las dihidroxi-ácido deshidratasa bacterianas con un conglomerado de [2Fe-2S] se identifican y expresan como proteínas heterólogas en huéspedes bacterianos y de levadura.

10 Antecedentes de la invención

- 15 La dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD), denominada también acetohidroxi-ácido deshidratasa, cataliza la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato y de 2,3-dihidroxiacetilvalerato en α -cetometilvalerato. La enzima DHAD, clasificada como E.C. 4.2.1.9, es parte de las rutas biosintéticas que se producen naturalmente que producen valina, isoleucina, leucina y ácido pantoténico (vitamina B5). Se desea elevada expresión de la actividad de DHAD para la potenciada producción microbiana de aminoácidos de cadena ramificada o de ácido pantoténico.

- 20 La conversión catalizada por DHAD de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato también es una etapa común en las múltiples rutas biosintéticas de isobutanol que se desvelan en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. del mismo solicitante y en tramitación junto con la presente US 20070092957 A1. En el presente documento se desvela la manipulación de microorganismos recombinantes para la producción de isobutanol. El isobutanol es útil como aditivo para combustible, cuya disponibilidad puede reducir la demanda de combustibles petroquímicos.

- 25 Para la producción mejorada de compuestos sintetizados en rutas que incluyen dihidroxi-ácido deshidratasa, se desea expresar una enzima heteróloga que proporciona esta actividad enzimática en la producción portadora de interés. La obtención de alta expresión funcional de dihidroxi-ácido deshidratasa en un huésped heterólogo se complica por el requisito de la enzima de un conglomerado de Fe-S, que implica la disponibilidad y carga adecuada del conglomerado en la apo-proteína DHAD.

- 30 Las enzimas DHAD que requieren el conglomerado Fe-S se conocen en la técnica y se encuentran tanto en la forma [4Fe-4S] como [2Fe-2S]. Se conocen algunas enzimas bacterianas, siendo la mejor caracterizada *E. coli* (Flint, DH y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:14732-14742). Sin embargo estas enzimas bacterianas están todas en la forma [4Fe-4S]. La única forma de [2Fe-2S] informada hasta la fecha es una enzima de espinaca (Flint y Emptage (1988) J. Biol. Chem. 263:3558-3564).

Se desea usar la forma [2Fe-2S] de la enzima en células huésped para potenciar la producción de rutas biosintéticas introducidas ya que la forma [2Fe-2S] crea una menor carga sobre la síntesis y/o ensamblaje del conglomerado Fe-S. Desafortunadamente, solo se conoce una forma [2Fe-2S] de esta enzima.

- 35 Por tanto, existe una necesidad de identificar nuevas formas de [2Fe-2S] de DHAD para su uso en células huésped recombinantes en las que la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato es una etapa de ruta metabólica en una ruta biosintética deseada.

Compendio de la invención

En el presente documento se proporciona un método de identificación de enzimas [2Fe-2S] DHAD, comprendiendo dicho método:

- 40 a) consultar una o más secuencias de aminoácidos con un perfil modelo oculto de Markov preparado usando las proteínas de SEC ID N°: 164, 168, 230, 232, 298, 310, 344 y 346, en el que una coincidencia con un valor de E inferior a 10^{-5} proporciona un primer subconjunto de secuencias, por el cual dicho primer subconjunto de secuencias se corresponde con una o más proteínas relacionadas con DHAD;
- 45 b) analizar el primer subconjunto de secuencias que se corresponde con una o más proteínas relacionadas con DHAD de la etapa (a) para la presencia de tres cisteínas conservadas que se corresponden con las posiciones 56, 129 y 201 en la secuencia de aminoácidos de dihidroxi-ácido deshidratasa de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168), por el cual se identifican un segundo subconjunto de secuencias que codifica enzimas [2Fe-2S] DHAD; y
- 50 c) analizar dicho segundo subconjunto de secuencias de la etapa (b) para la presencia de aminoácidos conservados distintivos en las posiciones correspondientes a posiciones en la secuencia de aminoácidos de DHAD de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168) que son ácido aspártico en la posición 88, arginina o asparagina en la posición 142, asparagina en la posición 208 y leucina en la posición 454, por el cual se identifican adicionalmente un tercer subconjunto de secuencias que codifica enzimas [2Fe-2S] DHAD.

En otro aspecto de la invención, el método anterior comprende además:

d) expresar un polipéptido que tiene una secuencia identificable por una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c) en una célula; y

e) confirmar que dicho polipéptido tiene actividad de DHAD en la célula.

5 En otro aspecto de la invención, el método anterior comprende además:

d) purificar una proteína codificada por una secuencia identificable por una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c); y

e) confirmar que dicha proteína es una enzima [2Fe-2S] DHAD por espectroscopía UV-vis y EPR.

10 En otro aspecto de la invención, el método anterior comprende además seleccionar una o más secuencias correspondientes a secuencias de la enzima [2Fe-2S] DHAD bacteriana identificadas en una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c). Dichas secuencias seleccionadas pueden expresarse en una célula; y la actividad de DHAD en la célula puede confirmarse. Dichas secuencias seleccionadas pueden purificarse adicionalmente de forma que se obtenga una proteína purificada y la actividad de la enzima [2Fe-2S] DHAD de dicha proteína purificada puede confirmarse por espectroscopía UV-vis y EPR.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una célula huésped microbiana que comprende al menos una enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga identificable por los métodos descritos en el presente documento en la que dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga no es una enzima de espinaca. Dicha célula puede ser una célula bacteriana o una célula de levadura. La célula también puede ser una célula recombinante que produce isobutanol. Realizaciones de la célula huésped microbiana son como se definen en las reivindicaciones. En particular, en una realización, dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que coincide con un perfil modelo oculto de Markov preparado usando las proteínas de SEC ID N°: 164, 168, 230, 232, 298, 310, 344 y 346, con un valor de E inferior a 10^{-5} ;

(b) tres cisteínas conservadas que se corresponden con las posiciones 56, 129 y 201 en la secuencia de aminoácidos de dihidroxi-ácido deshidratasa de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168); y

25 (c) aminoácidos conservados distintivos en las posiciones correspondientes a las posiciones en la secuencia de aminoácidos de DHAD de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168) que son ácido aspártico en la posición 88, arginina o asparagina en la posición 142, asparagina en la posición 208 y leucina en la posición 454. En otra realización, dicha célula carece de actividad de DHAD endógena. En otra realización, la DHAD heteróloga es una DHAD bacteriana. En otra realización, la DHAD heteróloga se deriva de *Streptococcus mutans* o *Lactococcus lactis*.

30 En otra realización, la enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 168 o SEC ID N°: 232 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad o al menos el 95 % de identidad con la misma. En otra realización, dicha célula es una célula bacteriana, preferentemente un miembro de un género de bacterias seleccionado del grupo que consiste en *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, y *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, o una célula de levadura, preferentemente un miembro de un género de levadura seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Pichia*, más preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*. En otra realización, dicha célula huésped comprende una ruta biosintética de isobutanol, preferentemente la ruta biosintética de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

(i) piruvato en acetolactato;

(ii) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato:

(iii) 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato:

(iv) α -cetoisovalerato en isobutiraldehído: y

45 (v) isobutiraldehído en isobutanol,

más preferentemente, la conversión de sustrato en producto de piruvato en acetolactato se cataliza por una acetolactato sintasa;

la conversión de sustrato en producto de acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato se cataliza por una cetol-ácido reductoisomerasa;

50 la conversión de sustrato en producto de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato se cataliza por la DHAD heteróloga;

la conversión de sustrato en producto de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído se cataliza por una α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada; y

la conversión de sustrato en producto de isobutiraldehído en isobutanol se cataliza por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada. En otra realización, dicha célula produce isobutanol.

5 Otro aspecto de la invención es un método para la producción de isobutanol que comprende:

a) proporcionar la célula huésped microbiana que comprende al menos una enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga identificable por los métodos descritos en el presente documento en el que dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga no es una enzima de espinaca y en el que dicha célula huésped comprende además una ruta biosintética de isobutanol; y

10 b) cultivar la célula huésped de la etapa (a) en condiciones en las que se produce isobutanol.

Otro aspecto de la invención es un método para la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato que comprende:

15 a) proporcionar una célula huésped microbiana que comprende al menos una enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga identificable por los métodos descritos en el presente documento en el que dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga no es una enzima de espinaca y una fuente de 2,3-dihidroxiisovalerato; y

b) cultivar la célula huésped microbiana de (a) en condiciones en las que el 2,3-dihidroxiisovalerato se convierte en α -cetoisovalerato.

Breve descripción de las figuras y descripciones de secuencias

20 La invención puede entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción detallada, figura y las descripciones de secuencia adjuntas, que forman una parte de la presente solicitud.

La Figura 1 muestra las regiones de cisteína conservadas, con C para cisteína en negrita, en [2Fe-2S] DHAD bacterianas representativas y una [4Fe-4S] DHAD. Se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

25 La Figura 2 muestra un árbol filogenético de proteínas relacionadas con DHAD. Están marcadas las ramas para [4Fe-4S] y [2Fe-2S] DHAD, además de EDD, ácido aldónico deshidratasa y un grupo indefinido (Ind). Se marcan DHAD individuales seleccionadas.

La Figura 3 muestra rutas biosintéticas para la producción de isobutanol.

La Figura 4 muestra gráficas de estabilidad de la actividad en aire de A) DHAD de *S. mutans*, y B) DHAD de *E. coli*.

La Figura 5 muestra una representación del espectro UV-visible de DHAD de *S. mutans*.

30 La Figura 6 muestra una representación del espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de DHAD de *S. mutans* a diferentes temperaturas entre 20 K y 90 K.

La Figura 7 muestra análisis de HPLC de un extracto de células de levadura que expresan genes acetolactato sintasa, KARI y DHAD de *S. mutans*, con un pico de isobutanol a 47,533 minutos.

La Figura 8 muestra una gráfica de estabilidad de DHAD de *L. lactis* en aire.

La Figura 9 muestra una representación del espectro de UV-visible de DHAD de *L. lactis* purificada.

35 La Tabla 1 es una tabla del perfil HMM para dihidroxi-ácido deshidratasa basado en enzimas con función ensayada preparadas como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 1 se presenta electrónicamente con la presente.

40 Las siguientes secuencias conforme al Art. 37 del CFR nº 1.821-1.825 ("Requisitos para solicitudes de patente que contienen divulgaciones de secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos – las Reglas de secuencias") y están de acuerdo con la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) Norma ST. 25 (1998) y los requisitos del listado de secuencias de la OEP y PCT (Reglas 5.2 y 49.5(a-bis) y Sección 208 y Anexo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y formato usados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen las reglas expuestas en el Art. 37 del CFR nº 1.822.

Tabla 2a. Proteínas de [2Fe-2S] DHAD bacterianas representativas y secuencias codificantes

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
Mycobacterium sp. MCS	1	2

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	3	4
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155	5	6
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	7	8
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	9	10
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	11	12
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99	13	14
<i>Mycobacterium avium</i> subs. paratuberculosis K-10	15	16
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	17	18
<i>Mycobacterium leprae</i> TN *	19	20
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	21	22
<i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	23	24
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	25	26
<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC 33209	27	28
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	29	30
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. xyli str. CTCB07	31	32
<i>Actinobacteria marina</i> PHSC20C1	33	34
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. michiganensis NCPPB 382	35	36
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	37	38
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11 B	39	40
<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	41	42
<i>Brevibacterium linens</i> BL2	43	44
<i>Tropheryma whipplei</i> TW08/27	45	46
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	47	48
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	428	429
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	49	50
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	51	52
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	53	54
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	55	56
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	57	58
<i>Fulvimarina pelagi</i> HTCC2506	59	60
<i>Aurantimonas</i> sp. SI85-9A1	61	62
<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	63	64
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	65	66
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	67	68

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
Parvibaculum lavamentivorans DS-1	69	70
Loktanella vestfoldensis SKA53	71	72
Roseobacter sp. CCS2	73	74
Dinoroseobacter shibae DFL 12	75	76
Roseovarius nubinhibens ISM	77	78
Sagittula stellata E-37	79	80
Roseobacter sp. AzwK-3b	81	82
Roseovarius sp. TM1035	83	84
Oceanicola batsensis HTCC2597	85	86
Oceanicola granulosus HTCC2516	87	88
Bacteria Rhodobacterales HTCC2150	89	90
Paracoccus denitrificans PD1222	91	92
Oceanibulbus indolifex HEL-45	93	94
Sulfitobacter sp. EE-36	95	96
Roseobacter denitrificans OCh 114	97	98
Jannaschia sp. CCS1	99	100
Caulobacter sp. K31	101	102
Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062	103	104
Erythrobacter litoralis HTCC2594	105	106
Erythrobacter sp. NAP1	107	108
Comamonas testosterone KF-1	109	110
Sphingomonas wittichii RW1	111	112
Burkholderia xenovorans LB400	113	114
Burkholderia phytofirmans PsJN	115	116
Bordetella petrii DSM 12804	117	118
Bordetella bronchiseptica RB50	119	120
Bradyrhizobium sp. ORS278	121	122
Bradyrhizobium sp. BTAi1	123	124
Bradyrhizobium japonicum	125	126
Sphingomonas wittichii RW1	127	128
Rhodobacterales bacterium HTCC2654	129	130
Solibacter usitatus Ellin6076	131	132
Roseiflexus sp. RS-1	133	134
Rubrobacter xylanophilus DSM 9941	135	136

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
Salinispora tropica CNB-440	137	138
Acidobacteria bacterium Ellin345	139	140
Thermus thermophilus HB27	141	142
Maricaulis maris MCS10	143	144
Parvularcula bermudensis HTCC2503	145	146
Oceanicaulis alexandrii HTCC2633	147	148
Plesiocystis pacifica SIR-1	149	150
Bacillus sp. NRRL B-14911	151	152
Oceanobacillus iheyensis HTE831	153	154
Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305	155	156
Bacillus selenitireducens MLS10	157	158
Streptococcus pneumoniae SP6-BS73	159	160
Streptococcus sanguinis SK36	161	162
Streptococcus thermophilus LMG 18311	163	164
Streptococcus suis 89/1591	165	166
Streptococcus mutans UA159	167	168
Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo-ovis L550	169	170
Candidatus Vesicomysocius okutanii HA	171	172
Candidatus Ruthia magnifica str. Cm (Calyptogena magnifica)	173	174
Methylococcus capsulatus str. Bath	175	176
bacteria marina no cultivada EB80_02D08	177	178
proteobacteria gamma marina no cultivada EBAC31A08	179	180
proteobacteria gamma marina no cultivada EBAC20E09	181	182
proteobacteria gamma no cultivada eBACHOT4E07	183	184
Alcanivorax borkumensis SK2	185	186
Chromohalobacter salexigens DSM 3043	187	188
Marinobacter algicola DG893	189	190
Marinobacter aquaeolei VT8	191	192
Marinobacter sp. ELB17	193	194
Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125	195	196
Acinetobacter sp. ADP1	197	198
Opitutaceae bacterium TAV2	199	200
Flavobacterium sp. MED217	201	202
Cellulophaga sp. MED134	203	204

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
Kordia algicida OT-1	205	206
Flavobacteriales bacterium ALC-1	207	208
Psychroflexus torquis ATCC 700755	209	210
Flavobacteriales bacterium HTCC2170	211	212
unidentified eubacterium SCB49	213	214
Gramella forsetii KT0803	215	216
Robiginitalea biformata HTCC2501	217	218
Tenacibaculum sp. MED152	219	220
Polaribacter irgensii 23-P	221	222
Pedobacter sp. BAL39	223	224
Flavobacteria bacterium BAL38	225	226
Flavobacterium psychrophilum JIP02/86	227	228
Flavobacterium johnsoniae UW101	229	230
Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11	231	232
Psychromonas ingrahamii 37	233	234
Microscilla marina ATCC 23134	235	236
Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	237	238
Rhodopirellula baltica SH 1	239	240
Blastopirellula marina DSM 3645	241	242
Planctomyces maris DSM 8797	243	244
Algoriphagus sp. PR1	245	246
Candidatus Sulcia muelleri str. Hc (Homalodisca coagulata)	247	248
Candidatus Carsonella ruddii PV	249	250
Synechococcus sp. RS9916	251	252
Synechococcus sp. WH 7803	253	254
Synechococcus sp. CC9311	255	256
Synechococcus sp. CC9605	257	258
Synechococcus sp. WH 8102	259	260
Synechococcus sp. BL107	261	262
Synechococcus sp. RCC307	263	264
Synechococcus sp. RS9917	265	266
Synechococcus sp. WH 5701	267	268
Prochlorococcus marinus str. MIT 9313	269	270
Prochlorococcus marinus str. NATL2A	271	272

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9215	273	274
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. AS9601	275	276
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9515	277	278
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1986	279	280
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9211	281	282
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> str. CCMP1375	283	284
<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	285	286
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	287	288
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	289	290
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	291	292
<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	293	294
<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	295	296
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	297	298
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	426	427
<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	299	300
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	301	302
<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a(2-13)	303	304
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	305	306
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91	307	308
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	309	310
<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196	311	312
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	313	314
<i>Leptospirillum</i> sp. Grupo II UBA	315	316
<i>Leptospirillum</i> sp. Grupo II UBA	317	318
<i>Halorhodospira halophila</i> SL1	319	320
<i>Nitrococcus mobilis</i> Nb-231	321	322
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1	323	324
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	325	326
<i>Polynucleobacter</i> sp. QLW-P1DMWA-1	327	328
<i>Polynucleobacter necessarius</i> STIR1	329	330
<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	331	332
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	333	334
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	335	336
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	337	338

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: Ácido nucleico	SEC ID N°: Péptido
Burkholderia cenocepacia PC184	339	340
Burkholderia mallei GB8 horse 4	341	342
Ralstonia eutropha JMP134	343	344
Ralstonia metallidurans CH34	345	346
Ralstonia solanacearum UW551	347	348
Ralstonia pickettii 12J	349	350
Limnobacter sp. MED105	351	352
Herminiimonas arsenicoxydans	353	354
Bordetella parapertussis	355	356
Bordetella petrii DSM 12804	357	358
Polaromonas sp. JS666	359	360
Polaromonas naphthalenivorans CJ2	361	362
Rhodoferrax ferrireducens T118	363	364
Verminephrobacter eiseniae EF01-2	365	366
Acidovorax sp. JS42	367	368
Delftia acidovorans SPH-1	369	370
Methylibium petroleiphilum PM1	371	372
Proteobacteria gamma KT 71	373	374
Tremblaya princeps	375	376
Blastopirellula marina DSM 3645	377	378
Planctomyces maris DSM 8797	379	380
Salinibacter ruber DSM 13855	387	388

Tabla 2b. Proteínas de [2Fe-2S] DHAD bacterianas representativas adicionales y secuencias codificantes

Organismo de derivación	SEC ID N°: de ácido nucleico	SEC ID N°: de péptido
Burkholderia ambifaria AMMD	443	444
Bradyrhizobium sp. BTAi1	445	446
Delftia acidovorans SPH-1	447	448
Microcystis aeruginosa NIES-843	449	450
Microorganismo marino no cultivado HF4000_APKG8C21	451	452
Burkholderia ubonensis Bu	453	454
Gemmata obscuriglobus UQM 2246	455	456
Mycobacterium abscessus	457	458
Synechococcus sp. PCC 7002	459	460

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: de ácido nucleico	SEC ID N°: de péptido
Burkholderia graminis C4D1M	461	462
Methylobacterium radiotolerans JCM 2831	463	464
Leptothrix cholodnii SP-6	465	466
Verrucomicrobium spinosum DSM 4136	467	468
Cyanothece sp. ATCC 51142	469	470
Opitutus terrae PB90-1	471	472
Leptospira biflexa serovar Patoc cepa 'Patoc 1 (Paris)'	473	474
Methylacidiphilum inferorum V4	475	476
Cupriavidus taiwanensis	477	478
Chthoniobacter flavus Ellin428	479	480
Cyanothece sp. PCC 7822	481	482
Phenylobacterium zucineum HLK1	483	484
Leptospirillum sp. Group II '5-waxy CG'	485	486
Arthrospira maxima CS-328	487	488
Oligotropha carboxidovorans OM5	489	490
Rhodospirillum centenum SW	491	492
Cyanothece sp. PCC 8801	493	494
Thermus aquaticus Y51 MC23	495	496
Cyanothece sp. PCC 7424	497	498
Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270	499	500
Cyanothece sp. PCC 7425	501	502
Arthrobacter chlorophenolicus A6	503	504
Burkholderia multivorans CGD2M	505	506
Thermomicrobium roseum DSM 5159	507	508
bacteria Ellin514	509	510
Desulfobacterium autotrophicum HRM2	511	512
Thioalkalivibrio sp. K90mix	513	514
Flavobacteria bacterium MS024-3C	515	516
Flavobacteria bacterium MS024-2A	517	518
'Nostoc azollae' 0708	519	520
Acidobacterium capsulatum ATCC 51196	521	522
Gemmatimonas aurantiaca T-27	523	524
Gemmatimonas aurantiaca T-27	525	526
Rhodococcus erythropolis PR4	527	528

ES 2 521 675 T3

Organismo de derivación	SEC ID N°: de ácido nucleico	SEC ID N°: de péptido
<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	529	530
<i>Rhodococcus opacus</i> B4	531	532
<i>Chryseobacterium gleum</i> ATCC 35910	533	534
<i>Thermobaculum terrenum</i> ATCC BAA-798	535	536
<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836	537	538
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247	539	540
<i>Geodermatophilus obscurus</i> DSM 43160	541	542
<i>Xylanimonas cellulositytica</i> DSM 15894	543	544
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33300	545	546
<i>Meiothermus silvanus</i> DSM 9946	547	548
<i>Meiothermus ruber</i> DSM 1279	549	550
<i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233	551	552
<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM 20109	553	554
<i>Rhodothermus marinus</i> DSM 4252	555	556
<i>Planctomyces limnophilus</i> DSM 3776	557	558
<i>Beutenbergia cavernae</i> DSM 12333	559	560
<i>Spirosoma linguale</i> DSM 74	561	562
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	563	564
<i>Lactococcus lactis</i>	565	566
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	567	568
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	569	570
<i>Roseovarius</i> sp. 217	571	572
clon de <i>Prochlorococcus marinus</i> no cultivado HF10-88D1	573	574
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	575	576
<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	577	578
<i>Pedobacter heparinus</i> DSM 2366	579	580
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420	581	582
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSM 10331	583	584
<i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2083	585	586
<i>Candidatus Pelagibacter</i> sp. HTCC7211	587	588
<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588	589	590
<i>Alcanivorax</i> sp. DG881	591	592
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	593	594
<i>Verrucomicrobiae bacterium</i> DG1235	595	596

Organismo de derivación	SEC ID N°: de ácido nucleico	SEC ID N°: de péptido
Synechococcus sp. PCC 7335	597	598
Brevundimonas sp. BAL3	599	600
Dyadobacter fermentans DSM 18053	601	602
Proteobacteria gamma NOR5-3	603	604
Proteobacteria gamma NOR51-B	605	606
Cyanobium sp. PCC 7001	607	608
Jonesia denitrificans DSM 20603	609	610
Brachybacterium faecium DSM 4810	611	612
Paenibacillus sp. JDR-2	613	614
Octadecabacter antarcticus 307	615	616
Variovorax paradoxus S110	617	618

Tabla 3. Números de SEC ID de proteínas adicionales y secuencias codificantes

Descripción	SEC ID N°: sec codificante	SEC ID N° proteína
Vibrio cholerae KARI	389	390
Pseudomonas aeruginosa PAO1 KARI	422	423
Pseudomonas fluorescens PF5 KARI	391	392
Butanol deshidrogenasa sadB de Achromobacter xylooxidans	393	394
Fosfogluconato deshidratasa de Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655	383	384
Arabonato deshidratasa de Azospirillum brasiliense	385	386
DHAD de Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655	381	382

- 5 SEC ID N°: 395-409, 412-421, 424 y 431-436 son cebadores para análisis de PCR, clonación o secuenciación usados como se describe en los ejemplos en el presente documento.
- SEC ID N°: 410 es la secuencia de nucleótidos del vector pDM1.
- SEC ID N°: 411 es la secuencia de nucleótidos del vector pLH532.
- SEC ID N°: 425 es el promotor FBA de *S. cerevisiae*.
- SEC ID N°: 430 es la secuencia de nucleótidos del vector pRS423 FBA ilvD (Strep).
- 10 SEC ID N°: 437 es la secuencia de nucleótidos del vector pNY13
- SEC ID N°: 438 es la región codificante alsS de *B. subtilis*.
- SEC ID N°: 439 es el promotor GPD de *S. cerevisiae*.
- SEC ID N°: 440 es el terminador CYC1 de *S. cerevisiae*.
- SEC ID N°: 442 es el gen ILV5 de *S. cerevisiae*.

15 **Descripción detallada de la invención**

Como se ha desvelado en el presente documento, los solicitantes han resuelto el problema establecido mediante el descubrimiento de métodos de identificación de [2Fe-2S] DHAD. Mediante el descubrimiento, estas enzimas y su uso en huéspedes recombinantes, se ha identificado una ventaja de actividad no apreciada hasta la fecha en la ingeniería de rutas con DHAD.

- 5 La presente invención se refiere a células de levadura o bacterianas recombinantes manipuladas para proporcionar la expresión heteróloga de dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD) que tiene un conglomerado de [2Fe-2S], en las que dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga no es una enzima de espinaca. La DHAD expresada sirve de componente de una ruta biosintética para la producción de un compuesto tal como valina, isoleucina, leucina, ácido pantoténico o isobutanol. Estos aminoácidos y ácido pantoténico pueden usarse como suplementos nutricionales, y el isobutanol puede usarse como aditivo para combustible para reducir la demanda de productos petroquímicos.

10 Las siguientes abreviaturas y definiciones se usarán para la interpretación de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

- 15 Como se usa en el presente documento, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, una composición, una mezcla, proceso, método, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente a solo aquellos elementos pero pueden incluir otros elementos no expresamente enumerados o inherentes a tal composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se establezca expresamente al contrario, “o” se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se cumple por una cualquiera de las siguientes: A es cierto (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es cierto (o presente), y tanto A como B son ciertos (o presentes).

- 20 Por tanto, los artículos indefinidos “un” y “una” precedentes a un elemento o componente de la invención pretenden ser no restrictivos con respecto al número de casos (es decir, manifestaciones) del elemento o componente. Por tanto “un” o “una” deben leerse para incluir uno o al menos uno, y la forma de la palabra en singular del elemento o componente también incluye el plural, a menos que el número pretenda ser obviamente en singular.

- 25 El término “invención” o “presente invención”, como se usa en el presente documento, es un término no limitante y no pretende referirse a ninguna realización individual de la invención particular, pero engloba todas las posibles realizaciones como se describen en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” que modifica la cantidad de un componente o reactante de la invención empleado se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede producirse, por ejemplo, mediante métodos típicos de medición y manipulación de líquidos usados para preparar concentrados o usar disoluciones en el mundo real; mediante el error involuntario en estos métodos; mediante diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los componentes empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” también engloba cantidades que se diferencian debido a diferentes condiciones de equilibrio para una composición resultante de una mezcla inicial particular. Si se modifica o no por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización, el término “aproximadamente” significa dentro del 10 % del valor numérico informado, preferentemente dentro del 5 % del valor numérico informado.

- 35 El término “[2Fe-2S] DHAD” se refiere a enzimas DHAD que tienen un conglomerado de [2Fe-2S] unido.

- 40 El término “[4Fe-4S] DHAD” se refiere a enzimas DHAD que tienen un conglomerado de [4Fe-4S] unido.

El término “dihidroxi-ácido deshidratasa” se abreviará DHAD y se referirá a una enzima que convierte 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato.

- 45 El término “ruta biosintética de isobutanol” se refiere a una ruta de enzima para producir isobutanol a partir de piruvato.

- El término “un anaerobio facultativo” se refiere a un microorganismo que puede crecer en entornos tanto aerobios como anaerobios.

- 50 El término “sustrato de carbono” o “sustrato de carbono fermentable” se refiere a una fuente de carbono que puede ser metabolizada por organismos huésped de la presente invención y particularmente fuentes de carbono seleccionadas del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sustratos de un carbono o mezclas de los mismos. Los sustratos de carbono pueden incluir azúcares C6 y C5 y mezclas de los mismos.

- 55 El término “gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que puede expresarse como una proteína específica, opcionalmente que incluye secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes de 5') y posteriores (secuencias no codificantes de 3') a la secuencia codificante. “Gen nativo” se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. “Gen quimérico” se refiere a cualquier gen que no sea un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por

consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de fuentes diferentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente al encontrado en la naturaleza. “Gen endógeno” se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un “gen extraño” o “gen heterólogo” se refiere a un gen normalmente no encontrado en el organismo huésped, pero que se introduce en el organismo huésped por transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un “transgén” es un gen que se ha introducido en el genoma por un método de transformación.

Como se usa en el presente documento, el término “región codificante” se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. “Secuencias reguladoras adecuadas” se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas en la dirección 5' (secuencias no codificantes de 5'), dentro de, o en la dirección 3' (secuencias no codificantes de 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias conductoras de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de la poliadenilación, sitio de procesamiento de ARN, sitio de unión al efector y estructura de tallo-lazo.

El término “promotor” se refiere a una secuencia de ADN que puede controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se localiza 3' con respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Se entiende por aquellos expertos en la materia que los diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones medioambientales o fisiológicas. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células la mayoría de las veces se denominan comúnmente “promotores constitutivos”. Además, se reconoce que, como en la mayoría de los casos los límites exactos de secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener actividad de promotor idéntica.

El término “operativamente ligadas” se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos sobre un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una sea afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor se liga operativamente a una secuencia codificante cuando puede efectuar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante esté bajo el control transcripcional de un promotor). Las secuencias codificantes pueden ligarse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término “expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la invención. La expresión también puede referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido.

Como se usa en el presente documento, el término “transformación” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en un organismo huésped, produciendo herencia genéticamente estable. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos “transgénicos” o “recombinantes” o “transformados”.

Los términos “plásmido” y “vector”, como se usan en el presente documento, se refieren a un elemento extracromosómico que frecuentemente lleva genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y normalmente en forma de moléculas de ADN bicatenario circular. Tales elementos pueden ser secuencias autónomamente replicantes, secuencias integrantes del genoma, secuencias de fago o de nucleótidos, lineal o circular, de ADN o ARN mono- o bicatenario, derivado de cualquier fuente, en el que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que puede introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con secuencia no traducida de 3' apropiada en una célula.

Como se usa en el presente documento, el término “degeneración de codones” se refiere a la naturaleza en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El experto conoce bien la “preferencia codónica” presentada por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por tanto, cuando se sintetiza un gen para la expresión mejorada en una célula huésped, se desea diseñar el gen de forma que su frecuencia de uso de codones se aproxime a la frecuencia de uso de codones preferida de la célula huésped.

El término “de codones optimizados”, como se refiere a genes o regiones codificantes de moléculas de ácidos nucleicos para la transformación de diversos huéspedes, se refiere a la alteración de codones en el gen o regiones codificantes de las moléculas de ácidos nucleicos para reflejar el uso típico de codones del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ADN.

Como se usa en el presente documento, un “fragmento de ácido nucleico aislado” o “molécula de ácido nucleico aislada” se usará indistintamente y significará un polímero de ARN o ADN que es mono- o bicatenario, que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico

aislado en forma de un polímero de ADN puede comprender uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Un fragmento de ácido nucleico es “hibridable” con otro fragmento de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o molécula de ARN, cuando una forma monocatenaria del fragmento de ácido nucleico puede hibridarse con el otro fragmento de ácido nucleico bajo las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en disolución. Las condiciones de hibridación y de lavado son muy conocidas y se ejemplifican en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989), particularmente Capítulo 11 y Tabla 11.1 dentro. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la “rigurosidad” de la hibridación. Las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para seleccionar fragmentos moderadamente similares (tales como secuencias homólogas de organismos lejanamente relacionados), a fragmentos altamente similares (tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos estrechamente relacionados). Los lavados de post-hibridación determinan las condiciones de rigurosidad. Un conjunto de condiciones preferidas usa una serie de lavados que empiezan con 6X SSC, 0,5 % SDS a temperatura ambiente durante 15 min, luego se repite con 2X SSC, 0,5 % de SDS a 45 °C durante 30 min, y luego se repite dos veces con 0,2X SSC, 0,5 % de SDS a 50 °C durante 30 min. Un conjunto más preferido de condiciones rigurosas usa mayores temperaturas en las que los lavados son idénticos a aquellos anteriores, excepto que la temperatura de los dos lavados finales de 30 min en 0,2X SSC, 0,5 % de SDS aumentó a 60 °C. Otro conjunto preferido de condiciones altamente rigurosas usa dos lavados finales en 0,1X SSC, 0,1 % de SDS, 65 °C y lavados con 2X SSC, 0,1 % de SDS seguido de 0,1X SSC, 0,1 % de SDS, por ejemplo.

La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles desapareamientos entre bases. La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables muy conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tm para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen aquellas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a mayor Tm) de la hibridación de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular Tm (véase Sambrook y col., arriba, 9.50-9.51). Para hibridaciones con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de desapareamientos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y col., arriba, 11.7-11.8). En una realización, la longitud para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferentemente, una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable tiene al menos aproximadamente 15 nucleótidos; más preferentemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos; y lo más preferentemente la longitud es al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Además, el experto reconocerá que la temperatura y concentración de la disolución de lavado de sales puede ajustarse según sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda.

Una “porción sustancial” de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos es aquella porción que comprende suficiente de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de un gen para identificar putativamente ese polipéptido o gen, tanto por evaluación manual de la secuencia por un experto en la materia como por comparación de secuencias automatizada por ordenador e identificación usando algoritmos tales como BLAST (Altschul, S. F., y col., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1993)). En general, es necesaria una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos con el fin de identificar putativamente un polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos como homóloga a una proteína o gen conocido. Además, con respecto a las secuencias de nucleótidos, sondas de oligonucleótidos específicas de genes que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos pueden usarse en métodos dependientes de secuencia de la identificación de genes (por ejemplo, hibridación de Southern) y aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos). Además, pueden usarse oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en PCR con el fin de obtener un fragmento particular de ácido nucleico que comprende los cebadores. Por consiguiente, una “porción sustancial” de una secuencia de nucleótidos comprende suficiente de la secuencia para identificar y/o aislar específicamente un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia. La presente memoria descriptiva enseña la secuencia de aminoácidos y nucleótidos completa que codifica proteínas particulares. El experto, que tiene el beneficio de las secuencias como se informa en el presente documento, puede ahora usar todas o una porción sustancial de las secuencias desveladas para los fines conocidos para aquellos expertos en esta materia. Por consiguiente, la presente invención comprende las secuencias completas como se informa en el listado de secuencias adjunto, además de porciones sustanciales de aquellas secuencias como se han definido anteriormente.

El término “complementario” se usa para describir la relación entre bases de nucleótidos que pueden hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto a ADN, la adenosina es complementaria a timina y la citosina es complementaria a guanina.

El término “identidad en porcentaje”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, como se ha determinado comparando las secuencias. En la materia, “identidad” o “identidad de secuencias” también significa el grado de vinculación de secuencias entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, como se ha determinado por la coincidencia entre filas de tales secuencias. La “identidad” y “similitud” pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en: 1.) *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., Ed.) Oxford

University: NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data. Part I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); y 5.) Sequence Analysis Primer (Gibbskov, M. y Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991).

5 Métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mejor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. Pueden realizarse cálculos de alineamientos de secuencias e identidad en porcentaje usando el programa MegAlign™ del paquete de cálculo bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI).
 10 Se realiza alineamiento múltiple de las secuencias usando el “método Clustal de alineamiento” que engloba varias variedades del algoritmo que incluye el “método Clustal V de alineamiento” correspondiente al método de alineamiento marcado Clustal V (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. y col., Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992)) y encontrado en el programa MegAlign™ del paquete de cálculo bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc.). Para alineamientos múltiples, los valores por defecto se corresponden con PENALIZACIÓN POR HUECO=10 y PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO=10. Los parámetros por defecto para alineamientos por emparejamiento y cálculo de identidad en porcentaje de secuencias de proteínas usando el método de Clustal son KTUPLE=1, PENALIZACIÓN POR HUECO=3, VENTANA=5 y DIAGONALES GUARDADAS=5. Para ácidos nucleicos, estos parámetros son KTUPLE=2, PENALIZACIÓN POR HUECO=5, VENTANA=4 y DIAGONALES GUARDADAS=4. Después del alineamiento de las secuencias usando el programa Clustal V es posible obtener una “identidad en porcentaje” visualizando la tabla de “distancias de secuencias” en el mismo programa. Adicionalmente, el “método Clustal W de alineamiento” está disponible y se corresponde con el método de alineamiento Clustal W marcado (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. y col., Comput. Appl. Biosci. 8:189-191(1992) Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson T. J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673 4680) y encontrado en el programa MegAlign™ v6.1 del paquete de cálculo bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc.). Los parámetros por defecto para alineamientos múltiples (PENALIZACIÓN POR HUECO=10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO=0,2, retardo de secuencias divergentes (%)=30, peso de la transición de ADN=0,5, matriz de pesos de proteínas=serie de Gonnet, matriz de pesos de ADN=IUB). Después del alineamiento de las secuencias usando el programa Clustal W es posible obtener una “identidad en porcentaje” visualizando la tabla de “distancias de secuencias” en el mismo programa.

30 Es bien entendido por un experto en la materia que muchos niveles de identidad de secuencias son útiles en identificar polipéptidos, de otras especies, en los que tales polipéptidos tienen la misma función o actividad o similar. Ejemplos útiles de porcentaje de identidades incluyen, pero no se limitan a: 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, o cualquier porcentaje en número entero del 55 % al 100 % puede ser útil en describir la presente invención, tal como 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 % o 99 %. Los fragmentos de ácido nucleico adecuados no solo tienen las homologías anteriores, sino que normalmente codifican un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos, preferentemente al menos 100 aminoácidos, más preferentemente al menos 150 aminoácidos, todavía más preferentemente al menos 200 aminoácidos, y lo más preferentemente al menos 250 aminoácidos.

40 El término “software de análisis de secuencias” se refiere a cualquier algoritmo informático o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. El “software de análisis de secuencias” puede estar comercialmente disponible o desarrollarse independientemente. El software de análisis de secuencias típico incluirá, pero no se limita a: 1.) el paquete de programas de GCG (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4.) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); y 5.) el programa FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY). Dentro del contexto de la presente solicitud se entenderá que cuando el software de análisis de secuencias se usa para el análisis, que los resultados del análisis se basarán en los “valores por defecto” del programa referenciado, a menos que se especifique de otro modo. Como se usa en el presente documento, “valores por defecto” significarán cualquier conjunto de valores o parámetros que se cargan originalmente con el software cuando se inicializa por primera vez.

55 Las técnicas de clonación de ADN recombinante y molecular convencionales usadas aquí son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (denominado en lo sucesivo “Maniatis”); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. y Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987). Métodos adicionales usados aquí están en Methods in Enzymology, volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Parte A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA).

Descubrimiento de [2Fe-2S] DHAD

Las proteínas DHAD son conocidas por contener un conglomerado de hierro-azufre (Fe-S) unido que se requiere para la actividad enzimática. La única DHAD con un conglomerado de [2Fe-2S] informada hasta la fecha es una enzima de espinaca (Flint y Emptage (1988) J. Biol. Chem. 263:3558-3564). También se conocen algunas enzimas bacterianas, siendo de ellas la mejor caracterizada de *E. coli* (Flint, DH y col. (1993) J. Biol. Chem. 268:14732-14742), que tiene un conglomerado [4Fe-4S].

Los solicitantes han determinado ahora que hay una clase de DHAD bacterianas que contienen un conglomerado [2Fe-2S] ([2Fe-2S] DHAD). Los solicitantes han encontrado que el grupo de [2Fe-2S] DHAD puede distinguirse de un grupo de [4Fe-4S] DHAD por la presencia de tres residuos de cisteína conservados en la proteína. Las tres cisteínas conservadas son similares a las tres cisteínas esenciales informadas en el arabonato (una ácido aldónico) deshidratasa de *Azospirillum brasiliense* ((Watanabe, S y col. J. Biol. Chem. (2006) 281:33521-33536) que se informó que contenía un conglomerado de [4Fe-4S]. En la proteína arabonato deshidratasa de *Azospirillum brasiliense* se determinó que las cisteínas localizadas en las posiciones de aminoácidos 56, 124 y 197 eran esenciales para la actividad enzimática y probablemente participaban en la coordinación con el conglomerado de Fe-S. Sorprendentemente, los solicitantes han encontrado que tres cisteínas conservadas, que están en posiciones correspondientes a las tres cisteínas esenciales de la arabonato deshidratasa de *Azospirillum brasiliense*, son características de DHAD que contienen un conglomerado de [2Fe-2S]. Los solicitantes han encontrado que la DHAD de *E. coli*, que contiene un conglomerado de [4Fe-4S], tiene dos de las cisteínas conservadas, pero no la tercera cisteína conservada. En la Figura 1 se muestra una comparación de las regiones de secuencia de las cisteínas conservadas para las DHAD que contienen conglomerado de [4Fe-4S] de *E. coli* y para representantes de un grupo filogenético de DHAD de conglomerado de [2Fe-2S] que se identificó en el presente documento en el Ejemplo 1 y se describe más adelante.

Los solicitantes han desarrollado un método de identificación de [2Fe-2S] DHAD. En la presente invención, [2Fe-2S] DHAD bacterianas, que pueden identificarse por este método, pueden usarse para expresión heteróloga en bacterias.

Para caracterizar estructuralmente enzimas DHAD se preparó un perfil modelo oculto de Markov (HMM) como se describe en el Ejemplo 1 usando secuencias de aminoácidos de proteínas DHAD con función experimentalmente verificada, como se ha determinado en el Ejemplo 2 en el presente documento, y se facilita en la Tabla 1. Estas DHAD son de *Nitrosomonas europaea* (SEC ID N° de ADN: 309; SEC ID N° de proteína: 310), *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEC ID de ADN: 297; SEC ID N° de proteína: 298), *Streptococcus mutans* (SEC ID N° de ADN: 167; SEC ID N° de proteína: 168) *Streptococcus thermophilus* (SEC ID N° de ADN: 163; SEC ID N°: 164), *Ralstonia metallidurans* (SEC ID N° de ADN: 345; SEC ID N° de proteína: 346), *Ralstonia eutropha* (SEC ID N° de ADN: 343; SEC ID N° de proteína: 344), y *Lactococcus lactis* (SEC ID N° de ADN: 231; SEC ID N° de proteína: 232). Además, se encontró que la DHAD de *Flavobacterium johnsoniae* (SEC ID N° de ADN: 229; SEC ID N° de proteína: 230) tenía actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa cuando se expresó en *E. coli* y se usó en preparar el perfil. Este perfil HMM para DHAD puede usarse para identificar proteínas relacionadas con DHAD. Cualquier proteína que coincida con el perfil HMM con un valor de E de $< 10^{-5}$ es una proteína relacionada con DHAD, que incluye [4Fe-4S] DHAD, [2Fe-2S] DHAD, ácido aldónico deshidratasa y fosfogluconato deshidratasa. Un árbol filogenético de secuencias que coincide con este perfil HMM se muestra en la Figura 2.

Las secuencias que coinciden con el perfil HMM facilitadas en el presente documento se analizan entonces para la presencia de las tres cisteínas conservadas como se ha descrito anteriormente. Las posiciones exactas de las tres cisteínas conservadas pueden variar, y éstas pueden identificarse en el contexto de la secuencia de alrededor usando alineamientos múltiples de secuencias realizados con el algoritmo Clustal W (Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson T. J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673 4680) empleando los siguientes parámetros: 1) para parámetros de alineamiento por emparejamiento, una abertura de hueco = 10; extensión de hueco = 0,1; la matriz es Gonnet 250; y modo – Lento-preciso, 2) para parámetros de alineamiento múltiple, abertura de hueco = 10; extensión de hueco = 0,2; y la matriz es series de Gonnet. Por ejemplo, las tres cisteínas conservadas se localizan en las posiciones de aminoácidos 56, 129 y 201 en la DHAD de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168) y en las posiciones de aminoácidos 61, 135 y 207 en la DHAD de *Lactococcus lactis* (SEC ID N°: 232). Las posiciones exactas de las tres cisteínas conservadas en otras secuencias de proteínas se corresponden con estas posiciones en la secuencia de aminoácidos de *S. mutans* o *L. lactis*. Un experto en la materia podrá identificar fácilmente la presencia o ausencia de cada una de las tres cisteínas conservadas en la secuencia de aminoácidos de una proteína DHAD usando alineamientos por emparejamiento o alineamientos múltiples de secuencias. Además, pueden usarse otros métodos para determinar la presencia de las tres cisteínas conservadas, tales como análisis a simple vista.

Las proteínas que coinciden con el perfil HMM de DHAD que tienen dos, pero no la tercera (posición 56) cisteína conservada, incluyen [4Fe-4S] DHAD y fosfogluconato deshidratasa (EDD). Las proteínas que tienen las tres cisteínas conservadas incluyen arabonato deshidratasa y [2Fe-2S] DHAD, y son miembros de un grupo de [2Fe-2S] DHAD/ácido aldónico deshidratasa. Las [2Fe-2S] DHAD pueden distinguirse de las ácido aldónico deshidratasa analizando aminoácidos conservados distintivos que se encuentra que están presentes en las [2Fe-2S] DHAD o en las ácido aldónico deshidratasa en las posiciones correspondientes a las siguiente posiciones en la secuencia de aminoácidos de DHAD de *Streptococcus mutans*. Estos aminoácidos distintivos están en [2Fe-2S] DHAD o en ácido aldónico deshidratasa, respectivamente, en las siguientes posiciones (con más del 90 % se aparición): 88

asparagina frente a ácido glutámico; 113 no conservada frente a ácido glutámico; 142 arginina o asparagina frente a no conservada; 165: no conservada frente a glicina; 208 asparagina frente a no conservada; 454 leucina frente a no conservada; 477 fenilalanina o tirosina frente a no conservada; y 487 glicina frente a no conservada.

5 Los métodos desvelados para la identificación de enzimas [2Fe-2S] DHAD pueden llevarse a cabo sobre una única secuencia o sobre un grupo de secuencias. En una realización preferida, una o más bases de datos de secuencias son consultadas con un perfil HMM como se describe en el presente documento. Bases de datos de secuencias adecuadas son conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, la base de datos de proteínas no redundantes Genbank, la base de datos SwissProt o la base de datos UniProt u otras bases de datos disponibles tales como GQPat (GenomeQuest, Westboro, MA) y BRENDA (Biobase, Beverly, MA).

10 Entre las [2Fe-2S] DHAD identificables por este método, las [2Fe-2S] DHAD bacterianas pueden ser fácilmente identificables por el organismo de fuente natural que es un tipo de bacteria. Cualquier [2Fe-2S] DHAD bacteriana identificable por este método puede ser adecuada para la expresión heteróloga en una célula huésped microbiana. También se apreciará que cualquier [2Fe-2S] DHAD bacteriana desvelada expresamente en el presente documento por secuencia puede ser adecuada para la expresión heteróloga en células bacterianas. Enzimas [2Fe-2S] DHAD
15 bacterianas preferidas pueden expresarse en una célula huésped y proporcionar actividad de DHAD.

Inicialmente se identificaron 193 [2Fe-2S] DHAD bacterianas diferentes con identidades de secuencia inferiores al 95 % (superiores al 95 % de identidad de proteínas eliminadas para simplificar el análisis) como se describe en el Ejemplo 1 y las secuencias de aminoácidos y codificantes de estas proteínas se proporcionan en el listado de secuencias, con SEC ID N° enumeradas en la Tabla 2a.

20 Un análisis posterior descrito en el Ejemplo 11 devolvió 268 [2Fe-2S] DHAD bacterianas diferentes. Las secuencias de aminoácidos y codificantes que no fueron idénticas a ninguna de las 193 [2Fe-2S] DHAD bacterianas proporcionadas por la identificación inicial están incluidas en el listado de secuencias, con SEC ID N° enumeradas en la Tabla 2b.

25 Cualquier proteína [2Fe-2S] DHAD que coincida con una secuencia identificable mediante los métodos desvelados en el presente documento o una secuencia expresamente desvelada en el presente documento con una identidad de al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % es una [2Fe-2S] DHAD que puede usarse para la expresión heteróloga en células bacterianas como se desvela en el presente documento. Entre las [2Fe-2S] DHAD bacterianas desveladas expresamente en el presente documento hay el 100 % de conservación de los aminoácidos distintivos en las posiciones: 88 ácido aspártico, 142 arginina o asparagina, 208 asparagina y 454 leucina.

30 Además, las [2Fe-2S] DHAD bacterianas que pueden usarse en la presente invención son identificables por su posición en la rama de [2Fe-2S] DHAD de un árbol filogenético de proteínas relacionadas con DHAD tales como las mostradas en la Figura 2 y descritas en el Ejemplo 1. Además, las [2Fe-2S] DHAD bacterianas que pueden usarse son identificables usando comparaciones de secuencias con cualquiera de las 281 [2Fe-2S] DHAD bacterianas cuyas secuencias se proporcionan en el presente documento, en las que la identidad de secuencias puede ser al
35 menos aproximadamente el 80 %-85 %, 85 %-90 %, 90 %-95 % o el 95 %-99 %.

Adicionalmente, las secuencias de [2Fe-2S] DHAD proporcionadas en el presente documento pueden usarse para identificar otros homólogos en la naturaleza. Por ejemplo, puede usarse cada uno de los fragmentos de ácido nucleico que codifican DHAD descritos en el presente documento para aislar genes que codifican proteínas homólogas. El aislamiento de genes homólogos usando protocolos dependientes de secuencia es muy conocido en
40 la técnica. Ejemplos de protocolos dependientes de secuencia incluyen, pero no se limitan a: 1.) métodos de hibridación de ácidos nucleicos; 2.) métodos de amplificación de ADN y ARN, como se ejemplifica por diversos usos de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos [por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis y col., patente de EE.UU. 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor, S. y col., Proc. Acad. Sci. USA 82:1074 (1985); o amplificación con desplazamiento de hebra (SDA), Walker, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992)]; y 3.) métodos de construcción y selección de bibliotecas por complementación.
45

Por ejemplo, los genes que codifican proteínas o polipéptidos similares a los genes que codifican [2Fe-2S] DHAD proporcionados en el presente documento podrían aislarse directamente usando toda o una porción de los presentes fragmentos de ácido nucleico como sondas de hibridación de ADN para cribar bibliotecas de cualquier organismo deseado usando metodología muy conocida para aquellos expertos en la materia. Pueden diseñarse y sintetizarse
50 sondas de oligonucleótidos específicas basadas en las secuencias de ácidos nucleicos desveladas mediante métodos conocidos en la técnica (Maniatis, arriba). Además, pueden usarse directamente secuencias enteras para sintetizar sondas de ADN mediante métodos conocidos para el experto (por ejemplo, marcado de ADN de cebadores aleatorios, traducción por muescas o técnica de marcado de los extremos), o sondas de ARN usando sistemas de transcripción *in vitro* disponibles. Además, pueden diseñarse cebadores específicos y usarse para amplificar una
55 parte de (o longitud completa de) las presentes secuencias. Los productos de amplificación resultantes pueden marcarse directamente durante las reacciones de amplificación o marcarse después de las reacciones de amplificación, y usarse como sondas para aislar fragmentos de ADN de longitud completa por hibridación en condiciones de rigurosidad apropiada.

Normalmente, en técnicas de amplificación tipo PCR, los cebadores tienen secuencias diferentes y no son complementarias entre sí. Dependiendo de las condiciones de prueba deseadas, las secuencias de los cebadores deben diseñarse para proporcionar tanto replicación eficiente como fidelidad del ácido nucleico diana. Los métodos de diseño de cebadores de PCR son comunes y muy conocidos en la técnica (Thein y Wallace, "The use of oligonucleotides as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders", en *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*, K. E. Davis Ed., (1986) pág 33-50, IRL: Herndon, VA; y Rychlik, W., en *Methods in Molecular Biology*, White, B. A. Ed., (1993) vol. 15, pág 31-39, PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana: Totowa, NJ).

Generalmente, dos segmentos cortos de las secuencias descritas pueden usarse en los protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar fragmentos de ácido nucleico más largos que codifican genes homólogos de ADN o ARN. La reacción en cadena de la polimerasa también puede realizarse en una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico clonados en los que la secuencia de un cebador se deriva de los fragmentos de ácido nucleico descritos, y la secuencia del otro cebador se aprovecha de la presencia de los tramos de ácido poliadenílico en el extremo 3' del precursor de ARNm que codifica genes microbianos.

Alternativamente, la segunda secuencia de cebador puede basarse en secuencias derivadas del vector de clonación. Por ejemplo, el experto puede seguir el protocolo de RACE (Frohman y col., PNAS USA 85:8998 (1988)) para generar ADNc usando PCR para amplificar copias de la región entre un único punto en el transcrito y el extremo 3' o 5'. Pueden diseñarse cebadores orientados en las direcciones 3' y 5' a partir de las presentes secuencias. Usando sistemas 3' RACE o 5' RACE comercialmente disponibles (por ejemplo, BRL, Gaithersburg, MD), pueden aislarse fragmentos de ADNc de 3' o 5' específicos (Ohara y col., PNAS USA 86:5673 (1989); Loh y col., Science 243:217 (1989)).

Alternativamente, las secuencias codificantes de [2Fe-2S] DHAD proporcionadas pueden emplearse como reactivos de hibridación para la identificación de homólogos. Los componentes básicos de una prueba de hibridación de ácido nucleico incluyen una sonda, una muestra que se sospecha que contiene el gen o fragmento del gen de interés y un método de hibridación específico. Las sondas son normalmente secuencias de ácidos nucleicos monocatenarias que son complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos que van a detectarse. Las sondas son "hibridables" con la secuencia de ácidos nucleicos que va a detectarse. La longitud de la sonda puede variar de 5 bases a decenas de miles de bases, y dependerá de la prueba específica a hacer. Normalmente, una longitud de las sondas de aproximadamente 15 bases a aproximadamente 30 bases es adecuada. Solo parte de la molécula de la sonda necesita ser complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos que va a detectarse. Además, la complementariedad entre la secuencia de la sonda y de diana no necesita ser perfecta. La hibridación se produce entre moléculas imperfectamente complementarias con el resultado de que una cierta fracción de las bases en la región hibridada no está emparejada con la base complementaria apropiada.

Los métodos de hibridación están bien definidos. Normalmente, la sonda y la muestra deben mezclarse en condiciones que permitirán la hibridación de ácidos nucleicos. Esto implica poner en contacto la sonda y muestra en presencia de una sal inorgánica u orgánica bajo las condiciones de concentración y temperatura apropiadas. Los ácidos nucleicos de la sonda y la muestra deben estar en contacto durante un tiempo suficiente para que pueda producirse cualquier hibridación posible entre el ácido nucleico de la sonda y la muestra. La concentración de sonda o diana en la mezcla determinará el tiempo necesario para que se produzca la hibridación. Cuanto mayor sea la concentración de sonda o diana, más corto será el tiempo de incubación de la hibridación necesario. Opcionalmente puede añadirse un agente caotrópico. El agente caotrópico estabiliza ácidos nucleicos inhibiendo la actividad de nucleasas. Además, el agente caotrópico permite hibridación sensible y rigurosa de sondas de oligonucleótidos cortas a temperatura ambiente (Van Ness y Chen, Nucl. Acids Res. 19:5143-5151(1991)). Agentes caotrópicos adecuados incluyen cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, tetracloroacetato de litio, perclorato de sodio, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio y trifluoroacetato de cesio, entre otros. Normalmente, el agente caotrópico estará presente a una concentración final de aproximadamente 3 M. Si se desea, puede añadirse formamida a la mezcla de hibridación, normalmente 30-50 % (v/v).

Pueden emplearse diversas disoluciones de hibridación. Normalmente, éstas comprenden de aproximadamente el 20 al 60 % en volumen, preferentemente el 30 %, de un disolvente orgánico polar. Una disolución de hibridación común emplea aproximadamente 30-50 % en v/v de formamida, cloruro sódico aproximadamente 0,15 a 1 M, tampones aproximadamente 0,05 a 0,1 M (por ejemplo, citrato de sodio, Tris-HCl, PIPES o HEPES (intervalo de pH aproximadamente 6-9)), aproximadamente 0,05 al 0,2 % de detergente (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio), o EDTA entre 0,5-20 mM, FICOLL (Farmacia Inc.) (aproximadamente 300-500 kdal), polivinilpirrolidona (aproximadamente 250-500 kdal) y albúmina de suero. También se incluirá en la disolución de hibridación típica ácidos nucleicos portadores no marcados de aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, ADN nucleico fragmentado (por ejemplo, ADN de timo bovino o de esperma de salmón, o ARN de levadura), y opcionalmente de aproximadamente el 0,5 al 2 % en peso/volumen de glicina. También pueden incluirse otros aditivos, tales como agentes de exclusión de volumen que incluyen una variedad de agentes polares solubles en agua o hinchables (por ejemplo, polietilenglicol), polímeros aniónicos (por ejemplo, poliacrilato o polimetilacrilato) y polímeros sacáricos aniónicos (por ejemplo, sulfato de dextrano).

La hibridación de ácidos nucleicos es adaptable a una variedad de formatos de ensayo. Uno de los más adecuados

es el formato de ensayo de sándwich. El ensayo de sándwich es particularmente adaptable a hibridación bajo condiciones no desnaturalizantes. Un componente primario de un ensayo tipo sándwich es un soporte sólido. El soporte sólido tiene adsorbido a él o acoplado covalentemente a él sonda de ácido nucleico inmovilizada que está sin marcar y es complementaria a una porción de la secuencia.

5 Expresión de [2Fe-2S] DHAD bacterianas heterólogas en huéspedes bacterianos y de levadura

Los solicitantes han encontrado que una [2Fe-2S] DHAD heteróloga proporciona actividad de DHAD cuando se expresa en una célula microbiana. Cualquier [2Fe-2S] DHAD que pueda identificarse como se describe en el presente documento puede expresarse en una célula microbiana heteróloga. La expresión de cualquiera de estas proteínas proporciona actividad de DHAD para una ruta biosintética que incluye conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato o 2,3-dihidroximetilvalerato en α -cetometilvalerato. La expresión de una [2Fe-2S] DHAD, a diferencia de una 4Fe-4D DHAD, reduce el requisito para Fe y S en conglomerados para obtener actividad enzimática. Además, se mostró que la [2Fe-2S] DHAD de *S. mutans* en el presente documento tenía mayor estabilidad en aire en comparación con la sensibilidad en aire de la [4Fe-4S] DHAD de *E. coli*, que se desea para obtener mejor actividad en una célula huésped heteróloga.

15 Células bacterianas que pueden ser huéspedes para la expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana heteróloga incluyen, pero no se limitan a, *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. La manipulación de la expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana heteróloga puede aumentar actividad de DHAD en una célula bacteriana huésped que expresa naturalmente una [2Fe-2S] DHAD o una [4Fe-4S] DHAD. Tales células huésped pueden incluir, por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Además, la manipulación de la expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana heteróloga proporciona actividad de DHAD en una célula bacteriana huésped que no tiene actividad de DHAD endógena. Tales células huésped pueden incluir, por ejemplo, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

25 Huéspedes específicos incluyen: *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis*.

Una célula bacteriana huésped puede manipularse para expresar una [2Fe-2S] DHAD bacteriana heteróloga mediante métodos muy conocidos para un experto en la materia. La región codificante para la DHAD que va a expresarse puede ser de codones optimizados para la célula huésped diana, como es muy conocido para un experto en la materia. Vectores útiles para la transformación de una variedad de células huésped son comunes y están comercialmente disponibles de empresas tales como EPICENTRE® (Madison, WI), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA), Stratagene (La Jolla, CA) y New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Normalmente, el vector contiene un marcador de selección y secuencias que permiten la replicación autónoma o integración cromosómica en el huésped deseado. Además, vectores adecuados comprenden una región promotora que aloja la iniciación de los controles de transcripción y una región de control de terminación de la transcripción, entre la que puede insertarse un fragmento de región codificante de ADN, para proporcionar la expresión de la región codificante insertada. Ambas regiones de control pueden derivarse de genes homólogos a la célula huésped transformada, aunque debe entenderse que tales regiones de control también pueden derivarse de genes que no son específicos para las especies específicas elegidas como huésped de producción.

Las regiones de control de la iniciación o promotores, que son útiles para accionar la expresión de regiones codificantes de [2Fe-2S] DHAD bacteriana en la célula huésped bacteriana deseada, son menos numerosas y familiares para aquellos expertos en la materia. Prácticamente cualquier promotor que pueda accionar estos elementos genéticos es adecuado para la presente invención que incluye, pero no se limita a, promotores *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac* y *trc* (útiles para la expresión en *Escherichia coli*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*); los promotores *amy*, *apr* y *npr*, y diversos promotores de fago útiles para la expresión en *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Paenibacillus macerans*; *nisA* (útil para la expresión de bacterias Gram-positivas, Eichenbaum y col., Appl. Environ. Microbiol. 64(8):2763-2769 (1998)); y el promotor P11 sintético (útil para la expresión en *Lactobacillus plantarum*, Rud y col., Microbiology 152:1011-1019 (2006)).

50 Las regiones de control de la terminación también pueden derivarse de diversos genes nativos para los huéspedes preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario; sin embargo, es más preferido si se incluye.

Ciertos vectores pueden replicarse en una amplia variedad de bacterias huésped y pueden transferirse por conjugación. Están disponibles la secuencia completa y anotada de pRK404 y tres vectores relacionados: pRK437, pRK442 y pRK442(H). Estos derivados han demostrado ser valiosas herramientas para la manipulación genética en bacterias Gram-negativas (Scott y col., Plasmid 50(1):74-79 (2003)). También están disponibles varios derivados de plásmido del plásmido Inc P4 de amplio espectro de huésped RSF1010 con promotores que pueden funcionar en una variedad de bacterias Gram-negativas. El plásmido pAYC36 y pAYC37 tienen promotores activos, junto con sitios de clonación múltiple para permitir la expresión génica heteróloga en bacterias Gram-negativas. Algunos

vectores que son útiles para la transformación de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus* incluyen pAMβ1 y derivados de los mismos (Renault y col., Gene 183:175-182 (1996); y O'Sullivan y col., Gene 137:227-231 (1993)); pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 (Wyckoff y col., Appl. Environ. Microbiol. 62:1481-1486 (1996)); pMG1, un plásmido conjugativo (Tanimoto y col., J. Bacteriol. 184:5800-5804 (2002)); pNZ9520 (Kleerebezem y col., Appl. Environ. Microbiol. 63:4581-4584 (1997)); pAM401 (Fujimoto y col., Appl. Environ. Microbiol. 67:1262-1267 (2001)); y pAT392 (Arthur y col., Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899-1903 (1994)). También se ha informado de varios plásmidos de *Lactobacillus plantarum* (van Kranenburg y col., Appl. Environ. Microbiol. 71(3):1223-1230 (2005)).

También están ampliamente disponibles herramientas de sustitución génica cromosómica. Por ejemplo, se ha modificado una variante termosensible del replicón de amplio espectro de huésped pWV101 para construir un plásmido pVE6002 que puede usarse para efectuar la sustitución génica en un intervalo de bacterias Gram-positivas (Maguin y col., J. Bacteriol. 174(17):5633-5638 (1992)). Adicionalmente están disponibles transposomas *in vitro* de fuentes comerciales tales como EPICENTRE® para crear mutaciones aleatorias en una variedad de genomas.

Las células de levadura que pueden ser huéspedes para la expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana heteróloga son cualquier célula de levadura que son susceptibles a manipulación genética e incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Pichia*. Cepas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Pichia stipitis* y *Yarrowia lipolytica*. La más adecuada es *Saccharomyces cerevisiae*.

La expresión se logra transformando con un gen que comprende una secuencia que codifica cualquiera de estas [2Fe-2S] DHAD. La región codificante para la DHAD que va a expresarse puede ser de codones optimizados para la célula huésped diana, como es muy conocido para un experto en la materia. Se conocen en la técnica métodos para la expresión génica en levadura (véase, por ejemplo, Methods in Enzymology, volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Parte A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA). La expresión de genes en levadura normalmente requiere un promotor, operativamente ligado a una región codificante de interés, y un terminador transcripcional. Pueden usarse varios promotores de levadura en la construcción de casetes de expresión para genes en levadura, que incluyen, pero no se limitan a, promotores derivados de los siguientes genes: *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI*, *CUP1*, *FBA*, *GPD*, *GPM* y *AOX1*. Terminadores transcripcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, FBA_t, GPD_t, GPM_t, ERG10_t, GAL1_t, CYC1 y ADH1.

Promotores adecuados, terminadores de la transcripción y regiones codificantes de [2Fe-2S] DHAD pueden clonarse en vectores lanzadera de levadura de *E. coli* y transformarse en células de levadura. Estos vectores permiten la propagación de cepas en tanto cepas de *E. coli* como de levadura. Normalmente, el vector usado contiene un marcador de selección y secuencias que permiten la replicación autónoma o integración cromosómica en el huésped deseado. Los plásmidos normalmente usados en levadura son los vectores lanzadera pRS423, pRS424, pRS425 y pRS426 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD), que contienen un origen de replicación de *E. coli* (por ejemplo, pMB1), un origen de replicación 2μ de levadura y un marcador para la selección nutricional. Los marcadores de selección para estos cuatro vectores son His3 (vector pRS423), Trp1 (vector pRS424), Leu2 (vector pRS425) y Ura3 (vector pRS426). La construcción de vectores de expresión con un gen quimérico que codifica las DHAD descritas puede realizarse por tanto técnicas de clonación molecular convencionales en *E. coli* como por el método de recombinación por reparación de huecos en levadura.

El enfoque de clonación por reparación de huecos se aprovecha de la recombinación homóloga altamente eficiente en levadura. Normalmente, un vector de levadura ADN se digiere (por ejemplo, en su sitio de clonación múltiple) para crear un "huevo" en su secuencia. Se generan varios ADN de inserto de interés que contienen una secuencia ≥ 21 pb en tanto los extremos 5' como 3' que se solapan secuencialmente entre sí, y con el extremo 5' y 3' del ADN de vector. Por ejemplo, para construir un vector de expresión en levadura para el "gen X", se seleccionan un promotor de levadura y un terminador de levadura para el casete de expresión. Un promotor y terminador se amplifican del ADN genómico de levadura, y el gen X tanto se amplifica por PCR de su organismo fuente como se obtiene de un vector de clonación que comprende la secuencia del gen X. Hay al menos una secuencia de solapamiento de 21 pb entre el extremo 5' del vector linealizado y la secuencia promotora, entre un promotor y el gen X, entre el gen X y la secuencia terminadora, y entre el terminador y el extremo 3' del vector linealizado. El vector "con huecos" y los ADN de inserto se co-transforman después en una cepa de levadura y se siembran en el medio que contiene las mezclas de compuestos apropiadas que permiten la complementación de los marcadores de selección nutricionales sobre los plásmidos. La presencia de combinaciones de inserto correctas puede confirmarse por mapeo por PCR usando ADN de plásmido preparado a partir de las células seleccionadas. El ADN de plásmido aislado de levadura (normalmente de baja concentración) puede entonces transformarse en una cepa de *E. coli*, por ejemplo, *TOP10*, seguido de mini-preparaciones y mapeo por restricción para verificar adicionalmente la construcción del plásmido. Finalmente, la construcción puede verificarse por análisis de secuencias.

Al igual que la técnica de reparación de huecos, la integración en el genoma de la levadura también se aprovecha del sistema de recombinación homóloga en levadura. Normalmente, un casete que contiene una región codificante más elementos de control (promotor y terminador) y marcador auxotrófico es amplificado por PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad usando cebadores que se hibridan con el casete y contienen 40-70 pares de bases de

homología de secuencias con las regiones 5' y 3' del área genómica en la que se desea la inserción. El producto de PCR se transforma entonces en levadura y se siembra sobre medio que contiene las mezclas de compuestos apropiadas que permiten la selección del marcador auxotrófico integrado. Por ejemplo, para integrar el "gen X" en la localización cromosómica "Y", una construcción de promotor-región codificante X-terminador se amplifica por PCR de una construcción de ADN de plásmido y se une a un marcador auxotrófico (tal como *URA3*) por tanto SOE-PCR como por digestos de restricción comunes y clonación. El casete completo, que contiene un promotor-región codificante X-terminador-región de *URA3*, se amplifica por PCR con secuencias de cebador que contienen 40-70 pb de homología con las regiones 5' y 3' de localización "Y" sobre el cromosoma de levadura. El producto de PCR se transforma en levadura y se selecciona sobre medios de crecimiento que carecen de uracilo. Los transformantes pueden verificarse tanto por PCR de colonias como por secuenciación directa de ADN cromosómico.

Confirmación de la actividad de DHAD

La presencia de actividad de DHAD en una célula manipulada para expresar una [2Fe-2S] DHAD bacteriana puede confirmarse usando métodos conocidos en la técnica. Como ejemplo, y como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, extractos en bruto de células manipuladas para expresar una [2Fe-2S] DHAD bacteriana pueden usarse en un ensayo de DHAD como se describe por Flint y Emptage (J. Biol. Chem. (1988) 263(8): 3558-64) usando dinitrofenilhidracina. En otro ejemplo, y como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, la actividad de DHAD puede ensayarse expresando una DHAD bacteriana identificable por los métodos desvelados en el presente documento en una cepa de levadura que carece de actividad de DHAD endógena. Si la actividad de DHAD está presente, la cepa de levadura crecerá en ausencia de aminoácidos de cadena ramificada. La actividad de DHAD también puede confirmarse por métodos más indirectos, tales como ensayando para un producto aguas abajo en una ruta que requiere actividad de DHAD. Cualquier producto que tenga α -cetometilvalerato o α -cetometilvalerato como producto intermedio de la ruta puede medirse como un ensayo para la actividad de DHAD. Una lista de tales productos incluye, pero no se limita a, valina, isoleucina, leucina, ácido pantoténico, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e isobutanol.

Producción de isobutanol

La expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana en bacterias o levadura, como se describe en el presente documento, provee a la célula huésped recombinante transformada de actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa para la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetometilvalerato o 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetometilvalerato. Cualquier producto que tenga α -cetometilvalerato o α -cetometilvalerato como producto intermedio de la ruta puede producirse con mayor eficacia en una cepa bacteriana o de levadura desvelada en el presente documento que tiene la [2Fe-2S] DHAD heteróloga descrita. Una lista de tales productos incluye, pero no se limita a, valina, isoleucina, leucina, ácido pantoténico, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e isobutanol.

Por ejemplo, en levadura, la biosíntesis de valina incluye las etapas de conversión de acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato por acetohidroxi-ácido reductoisomerasa (ILV5), conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetometilvalerato (denominado también 2-cetoisovalerato) por dihidroxi-ácido deshidratasa y conversión de α -cetometilvalerato en valina por transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BAT2) y aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BAT1). La biosíntesis de leucina incluye las mismas etapas para α -cetometilvalerato, seguido de conversión de α -cetometilvalerato en alfa-isopropilalato por alfa-isopropilalato sintasa (LEU9, LEU4), conversión de alfa-isopropilalato en beta-isopropilalato por isopropilalato isomerasa (LEU1), conversión de beta-isopropilalato en alfa-cetoisocaproato por beta-IPM deshidrogenasa (LEU2) y finalmente conversión de alfa-cetoisocaproato en leucina por transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BAT2) y aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BAT1). La ruta bacteriana es similar, que implica proteínas y genes nombrados de manera diferente. La elevada conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetometilvalerato aumentará el flujo en estas rutas, particularmente si una o más enzimas adicionales de una ruta se expresan en exceso. Así, para la producción de valina o leucina se desea usar una cepa desvelada en el presente documento.

La biosíntesis de ácido pantoténico incluye una etapa realizada por DHAD, además de etapas realizadas por cetopantoato hidroximetiltransferasa y pantotenato sintasa. La manipulación de la expresión de estas enzimas para la potenciada producción de la biosíntesis de ácido pantoténico en microorganismos se describe en el documento US 6177264.

El producto α -cetometilvalerato de DHAD es un producto intermedio en la ruta biosintética de isobutanoles desvelada en la publicación de patente de EE.UU. del mismo solicitante y en tramitación junto con la presente 20070092957 A1. Un diagrama de las rutas biosintéticas de isobutanol desvelado se proporciona en la Figura 3. La producción de isobutanol en una cepa desvelada en el presente documento se beneficia de la elevada actividad de DHAD. Como se desvela en el presente documento, la actividad de DHAD se proporciona por la expresión de una [2Fe-2S] DHAD bacteriana en una célula bacteriana o de levadura. Como se describe en el documento US 20070092957 A1, las etapas en una ruta biosintética de isobutanol de ejemplo incluyen la conversión de:

- piruvato en acetolactato (véase la Fig. 1, etapa a de la ruta allí dentro) como se cataliza, por ejemplo, por acetolactato sintasa,

- acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato (véase la Fig. 1, etapa b de la ruta allí dentro) como se cataliza, por ejemplo, por acetohidroxi-acido isomeroreductasa;

- 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato (véase la Fig. 1, etapa c de la ruta allí dentro) como se cataliza, por ejemplo, por acetohidroxi-ácido deshidratasa, denominada también dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD);

5 - α -cetoisovalerato en isobutiraldehído (véase la Fig. 1, etapa d de la ruta allí dentro) como se cataliza, por ejemplo, por la α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada; e

- isobutiraldehído en isobutanol (véase la Fig. 1, etapa e de la ruta allí dentro) como se cataliza, por ejemplo, por alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

10 Las conversiones de sustrato en producto, y las enzimas que participan en estas reacciones, para las etapas f, g, h, i, j y k de rutas alternativas se describen en el documento US 20070092957 A1.

15 Genes que pueden usarse para la expresión de las enzimas en las etapas de la ruta mencionadas anteriormente distintos de [2Fe-2S] DHAD bacterianas desveladas en el presente documento, además de aquellos para dos rutas de isobutanol adicionales, se describen en el documento US 20070092957 A1, y genes adicionales que pueden usarse puede identificarse por un experto en la materia mediante bioinformática o experimentalmente como se ha descrito anteriormente. El uso preferido en las tres rutas de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) con actividades particularmente altas se desvela en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. del mismo solicitante y en tramitación junto con la presente nº US20080261230A1. Ejemplos de KARI de alta actividad desvelados allí dentro son aquellos de *Vibrio cholerae* (ADN: SEC ID Nº: 389; SEC ID Nº de proteína: 390), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, (ADN: SEC ID Nº: 422; SEC ID Nº de proteína: 423) y *Pseudomonas fluorescens* PF5 (ADN: SEC ID Nº: 391; SEC ID Nº de proteína: 392).

20 Adicionalmente se describe en el documento US 20070092957 A1 la construcción de genes quiméricos e ingeniería genética de bacterias y levadura para la producción de isobutanol usando las rutas biosintéticas desveladas.

Crecimiento para la producción

25 Las bacterias recombinantes o huéspedes de levadura desvelados en el presente documento se cultivan en medios de fermentación que contienen sustratos de carbono adecuados. Sustratos de carbono adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, monosacáridos tales como fructosa, oligosacáridos tales como lactosa, maltosa, galactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos, y mezclas no purificadas de materias primas renovables tales como permeado de suero del queso, licor de maceración del maíz, melazas de remolacha azucarera y malta de cebada. Otros sustratos de carbono pueden incluir etanol, lactato, succinato o glicerol.

30 Adicionalmente, el sustrato de carbono también puede ser sustratos de un carbono tales como dióxido de carbono, o metanol para el que se ha demostrado la conversión metabólica en productos intermedios bioquímicos clave. Además de uno y dos sustratos de carbono, también se conocen organismos metilotróficos que utilizan varios otros compuestos que contienen carbono tales como metilamina, glucosamina y una variedad de aminoácidos para la actividad metabólica. Por ejemplo, se conocen levaduras metilotróficas que utilizan el carbono de metilamina para formar trehalosa o glicerol (Bellion y col., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32, Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, RU). Similarmente, diversas especies de *Candida* metabolizarán alanina o ácido oleico (Sulter y col., Arch. Microbiol. 153:485-489 (1990)). Por tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención pueda englobar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono y solo se limitará por la elección de organismo.

35 Aunque se contempla que todos los sustratos de carbono anteriormente mencionados y mezclas de los mismos son adecuados en la presente invención, sustratos de carbono preferidos son glucosa, fructosa y sacarosa, o mezclas de éstas con azúcares C5 tales como xilosa y/o arabinosa para células de levadura modificadas para usar azúcares C5. La sacarosa puede derivarse de fuentes de azúcar renovables tales como caña de azúcar, remolacha azucarera, yuca, sorgo dulce y mezclas de los mismos. La glucosa y la dextrosa pueden derivarse de fuentes de grano renovables mediante sacarificación de materias primas basadas en almidón que incluyen granos tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, y mezclas de los mismos. Además, los azúcares fermentables pueden derivarse de biomasa celulósica o lignocelulósica renovable mediante procesos de pretratamiento y sacarificación como se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. del mismo solicitante y en tramitación junto con la presente nº 2007/0031918A1. Biomasa se refiere a cualquier material celulósico o lignocelulósico e incluye materiales que comprenden celulosa, y opcionalmente que comprenden además hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos y/o monosacáridos. La biomasa también puede comprender componentes adicionales tales como proteína y/o lípido. La biomasa puede derivarse de una única fuente, o la biomasa puede comprender una mezcla derivada de más de una fuente; por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de mazorcas de maíz y hojas y tallos de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero no se limita a, cultivos de bioenergía, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, lodo de la fabricación del papel, residuos de jardín, residuos de madera y forestales. Ejemplos de la biomasa incluyen, pero no se limitan a,

50
55

grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como cáscaras de maíz, hojas y tallos de maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, césped de pradera, papel residual, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, arbustos y matorrales, verduras, frutas, flores, estiércol animal, y mezclas de los mismos.

- 5 Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación deben contener minerales adecuados, sales, cofactores, tampones y otros componentes, conocidos para aquellos expertos en la materia, adecuados para el crecimiento de los cultivos y promoción de una ruta enzimática que comprende una [2Fe-2S] DHAD bacteriana.

Condiciones de cultivo

- 10 Normalmente, las células se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C en un medio apropiado. Medios de crecimiento adecuados en la presente invención son medios comercialmente preparados comunes tales como caldo de Luria Bertani (LB), caldo de dextrosa Sabouraud (SD), caldo de medio de levadura (YM), o caldo que incluye base nitrogenada de levadura, sulfato de amonio y dextrosa (como fuente de carbono/energía) o medio YPD, una mezcla de peptona, extracto de levadura y dextrosa en proporciones óptimas para cultivar la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. También pueden usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos, y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular será conocido por un experto en la materia de la microbiología o ciencia de la fermentación. El uso de agentes conocidos para modular la represión de catabolitos directamente o indirectamente, por ejemplo, adenosina 2':3'-monofosfato cíclico, también puede incorporarse en el medio de fermentación.

- 15 Intervalos de pH adecuados para la fermentación de levadura normalmente están entre pH 3,0 y pH 9,0, en los que pH 5,0 a pH 8,0 se prefieren como condición inicial. Intervalos de pH adecuados para la fermentación de otros microorganismos están entre pH 3,0 y pH 7,5, en los que pH 4,5,0 a pH 6,5 se prefiere como condición inicial.

Las fermentaciones pueden realizarse bajo condiciones aerobias o anaerobias, prefiriéndose condiciones anaerobias o microaerobias.

Fermentaciones discontinuas y continuas industriales

- 25 La fermentación puede ser un método discontinuo de fermentación. Una fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado en el que la composición del medio se fija al principio de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Así, al principio de la fermentación el medio se inocula con el organismo u organismos deseados, y se deja que se produzca la fermentación sin añadir nada al sistema. Normalmente, sin embargo, la fermentación "discontinua" es discontinua con respecto a la adición de fuente de carbono y frecuentemente se hacen intentos por controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno.
- 30 En los sistemas discontinuos, las composiciones de metabolito y biomasa del sistema cambian constantemente hasta que se detiene el tiempo la fermentación. Dentro de los cultivos discontinuos, las células se moderan a través de un periodo de latencia estático a una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en la que la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria morirán eventualmente. Las células en la fase logarítmica generalmente son responsables de la masa de producción del producto final o producto intermedio.

- 35 Una variación del sistema discontinuo convencional es el sistema de alimentación discontinua. Los procesos de fermentación de alimentación discontinua también son adecuados en la presente invención y comprenden un sistema discontinuo típico, con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de alimentación discontinua son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y, si es deseable, limitar cantidades de sustrato en los medios. La medición de la actual concentración de sustrato en sistemas de alimentación discontinua es difícil y, por tanto, se estima basándose en los cambios de factores medibles tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO₂. Las fermentaciones discontinuas y de alimentación discontinua son comunes y muy conocidas en la técnica, y ejemplos pueden encontrarse en Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., o Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227, (1992).

- 40 El cultivo de fermentación puede adaptarse a métodos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto en el que un medio de fermentación definido se añade continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medios acondicionados se saca simultáneamente para procesar. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una alta densidad constante.

- 45 La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan el crecimiento celular o concentración de producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o nivel de nitrógeno a una tasa fija y permitirá moderar todos los otros parámetros. En otros sistemas varios, factores que afectan el crecimiento pueden alterarse continuamente mientras que la concentración de células, medida por la turbidez del medio de cultivo, se mantiene constante. Los sistemas continuos luchan por mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida de células debido a que el medio que se saca debe equilibrarse contra la tasa de crecimiento celular en la fermentación.

Métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continua, además de técnicas para maximizar la tasa de formación de producto, son muy conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos se detalla por Brock, arriba.

- 5 Se contempla que los procesos discontinuos, de alimentación discontinua, continuos, o cualquier modo conocido de fermentación, es adecuado para el crecimiento de la célula huésped microbiana recombinante descrita. Adicionalmente, se contempla que las células pueden inmovilizarse sobre un sustrato como catalizadores de células completas y someterse a condiciones de fermentación para la producción de isobutanol.

Métodos para el aislamiento de productos del medio de fermentación

- 10 El isobutanol bioproducido puede aislarse del medio de fermentación usando métodos conocidos en la técnica tales como para fermentaciones de ABE (véase, por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:639-648 (1998), Groot y col., Process Biochem. 27:61-75 (1992), y referencias en su interior). Por ejemplo, pueden eliminarse sólidos del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación o similares. Entonces, el isobutanol puede aislarse del medio de fermentación usando métodos tales como destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, arrastre con gas, evaporación en membrana o pervaporación.

- 15 Debido a que el isobutanol forma una mezcla azeotrópica de bajo punto de ebullición con el agua, puede usarse destilación para separar la mezcla hasta su composición azeotrópica. Puede usarse destilación en combinación con otro método de separación para obtener separación alrededor del azeótropo. Los métodos que pueden usarse en combinación con la destilación para aislar y purificar el butanol incluyen, pero no se limitan a, decantación, extracción líquido-líquido, adsorción y técnicas basadas en membrana. Adicionalmente, el butanol puede aislarse
20 usando destilación azeotrópica usando un agente de arrastre (véase, por ejemplo, Doherty y Malone, Conceptual Design of Distillation Systems, McGraw Hill, New York, 2001).

- La mezcla de butanol-agua forma un azeótropo heterogéneo de manera que puede usarse destilación en combinación con decantación para aislar y purificar el isobutanol. En este método, el isobutanol que contiene caldo de fermentación se destila hasta cerca de la composición azeotrópica. Entonces, la mezcla azeotrópica se condensa y el isobutanol se separa del medio de fermentación por decantación. La fase acuosa decantada puede devolverse a la primera columna de destilación como reflujo. La fase orgánica decantada rica en isobutanol puede purificarse adicionalmente mediante destilación en una segunda columna de destilación.

- El isobutanol también puede aislarse del medio de fermentación usando extracción líquido-líquido en combinación con destilación. En este método, el isobutanol se extrae del caldo de fermentación usando extracción líquido-líquido con un disolvente adecuado. La fase orgánica que contiene isobutanol se destila entonces para separar el butanol del disolvente.

- También puede usarse destilación en combinación con la adsorción para aislar isobutanol del medio de fermentación. En este método, el caldo de fermentación que contiene el isobutanol se destila hasta cerca de la composición azeotrópica y entonces el agua restante se elimina por uso de un adsorbente, tal como tamices moleculares (Aden y col., Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, Report NREL/TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory, junio de 2002).

- Adicionalmente, puede usarse destilación en combinación con pervaporación para aislar y purificar el isobutanol del medio de fermentación. En este método, el caldo de fermentación que contiene el isobutanol se destila hasta cerca de la composición azeotrópica y entonces el agua restante se elimina por pervaporación a través de una membrana hidrófila (Guo y col., J. Membr. Sci. 245, 199-210 (2004)).

Ejemplos

- La presente invención se define adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican una realización preferida de la invención, se facilitan a modo de ilustración solo. De la discusión anterior y estos ejemplos un experto en la materia puede determinar las características esenciales de la presente invención y, sin apartarse del espíritu y alcance de las mismas, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

MÉTODOS GENERALES

- Técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales descritas en los ejemplos son muy conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, (1989) (Maniatis) y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, y L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987) y por Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

- Materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son muy conocidos en la técnica. Técnicas adecuadas para su uso en los siguientes ejemplos pueden encontrarse como se explica en Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, DC. (1994) o por Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, segunda edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989). Todos los reactivos, enzimas de restricción y materiales usados para el crecimiento y mantenimiento de células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD), Life Technologies (Rockville, MD) o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), a menos que se especifique de otro modo.
- 5 Las cepas microbianas se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, a menos que se indique lo contrario. Los cebadores de oligonucleótidos usados en los siguientes ejemplos se sintetizaron por Sigma-Genosys (Woodlands, TX) o Integrated DNA Technologies (Coralsville, IA).

El medio completo sintético se describe en Amberg, Burke y Strathern, 2005, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

15 HPLC

- El análisis de la composición de los subproductos de fermentación es muy conocido para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utiliza una columna Shodex SH-1011 con una precolumna Shodex SH-G (ambas disponibles de Waters Corporation, Milford, MA), con detección del índice de refracción (IR). La separación cromatográfica se logra usando H₂SO₄ 0,01 M como fase móvil con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y una temperatura de la columna de 50 °C. El tiempo de retención del isobutanol es aproximadamente 47,6 minutos.

- El significado de las abreviaturas es el siguiente: “s” significa segundo(s), “min” significa minuto(s), “h” significa hora(s), “psi” significa libras por pulgada cuadrada, “nm” significa nanómetros, “d” significa día(s), “μl” significa microlitro(s), “ml” significa mililitro(s), “L” significa litro(s), “mm” significa milímetro(s), “nm” significa nanómetros, “mM” significa milimolar, “μM” significa micromolar, “M” significa molar, “mmol” significa milimol(es), “μmol” significa micromol(es), “g” significa gramo(s), “μg” significa microgramo(s) y “ng” significa nanogramo(s), “PCR” significa reacción en cadena de la polimerasa, “DO” significa densidad óptica, “DO₆₀₀” significa la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, “kDa” significa kilodalton, “g” significa la constante de la gravedad, “pb” significa par(es) de bases, “kpb” significa kilopar(es) de bases, “~” significa aproximadamente, “% en p/v” significa porcentaje en peso/volumen, % en v/v” significa porcentaje en volumen/volumen, “HPLC” significa cromatografía líquida de alta resolución y “CG” significa cromatografía de gases.

Ejemplo 1

Identificación de dihidroxi-ácido deshidratasa bacterianas con conglomerado de [2Fe-2S]

Análisis filogenético

- 35 Se determinaron relaciones filogenéticas para dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD) y proteínas relacionadas. Las proteínas relacionadas se identificaron mediante búsquedas con BlastP de bases de datos públicamente disponibles usando secuencias de aminoácidos de DHAD de *E. coli* (SEC ID N°: 382), fosfogluconato deshidratasa de *E. coli* (EDD; SEC ID N°: 384; SEC ID N° de la región codificante: 383) y arabinato deshidratasa de *Azospirillum brasiliense* (SEC ID N°: 386; SEC ID N° de la región codificante: 385), con los siguientes parámetros de búsqueda: valor de E = 10, tamaño de palabra = 3, matriz = Blosum62 y apertura de hueco = 11 y extensión de hueco = 1. Las búsquedas de Blast empleando las tres secuencias de proteínas diferentes generaron conjuntos que se solapan de coincidencias de secuencias. Las secuencias se seleccionaron de los resultados de búsqueda basados en el corte del valor de E de 10⁻⁵ con eliminación del 95 % de la identidad de secuencias. También se eliminaron las secuencias que fueron más cortas de 350 aminoácidos y secuencias que fueron más largas de 650 aminoácidos. El conjunto resultante de 976 secuencias de aminoácidos incluyó dihidroxi-ácido deshidratasa, fosfogluconato deshidratasa y ácido aldónico deshidratasa.

- Se generó un perfil HMM a partir de las DHAD experimentalmente verificadas descritas en el Ejemplo 2. Véanse los detalles más adelante sobre la construcción, calibración y búsqueda con este perfil HMM. Una búsqueda hmmer, usando este perfil HMM como consulta, por comparación con las 976 secuencias se coincidió con todas las secuencias con un valor de E de < 10⁻⁵. Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de las secuencias de aminoácidos con el algoritmo Clustal W (Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson T. J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673 4680) empleando los siguientes parámetros: 1) para parámetros de alineamiento por emparejamiento, una apertura de hueco = 10; extensión de hueco = 0,1; la matriz es Gonnet 250; y modo – Lento-preciso, 2) para parámetros de alineamiento múltiple, apertura de hueco = 10; extensión de hueco = 0,2; y la matriz es series de Gonnet. Se generaron árboles filogenéticos de alineamientos de secuencias basándose en el método de unión de vecinos. Un árbol que representa relaciones filogenéticas entre las 976 secuencias se muestra en la Figura 2. Emergieron cuatro ramas principales de este análisis. Se marcan “4Fe-4S DHAD”, “2Fe-2S DHAD”, “ácido aldónico deshidratasa” y “EDD”, basándose en los criterios detallados más adelante. Una quinta rama pequeña de 17

secuencias se marca como "Ind" de indefinida.

Las secuencias alineadas se analizaron inicialmente para la presencia de tres cisteínas determinadas por ser esenciales para la actividad enzimática y probablemente participaron en la coordinación de Fe-S en la arabonato deshidratasa de *Azospirillum brasiliense*, que se informó como una proteína de conglomerado de [4Fe-4S] (Watanabe, S y col., J. Biol. Chem. (2006) 281:33521-33536). Cada una de las 976 secuencias tiene las cisteínas correspondientes a dos de las cisteínas esenciales de arabonato deshidratasa de *Azospirillum brasiliense* (en las posiciones 124 y 197). Dentro del árbol filogenético, hay una rama de 168 secuencias que incluye la [4Fe-4S] fosfogluconato deshidratasa de *Zymomonas mobilis* (Rodríguez, M. y col. (1996) Biochem Mol Biol Int. 38:783-789). Solo se encontraron los cuatro aminoácidos alanina, valina o serina o glicina, pero no cisteína, en la posición de la tercera cisteína esencial de la arabonato deshidratasa de *A. brasiliense* (posición 56). Esta rama de 168 secuencias está marcada en la Figura 2 como "EDD".

Una rama diferente del árbol contiene 322 secuencias, entre las que está la DHAD de conglomerado [4Fe-4S] conocida de *E. coli*. Esta rama de 322 secuencias está marcada en la Figura 2 como "4Fe-4S DHAD". Todas las secuencias dentro de esta rama, y en la rama de 17 secuencias ("Ind"), contienen glicina en la posición correspondiente a la tercera cisteína. Las 469 secuencias restantes, que están conglomeradas en dos ramas y comprenden tanto la arabonato deshidratasa de *A. brasiliense* que reconoce ácido aldónico como un conjunto de DHAD, poseen las tres cisteínas. Estas cisteínas están en las posiciones 56, 129 y 201 en la DHAD de *S. mutans* (SEC ID N°: 168) y en las posiciones 61, 135 y 207 en la DHAD de *L. lactis* (SEC ID N°: 232). En la Figura 1 se muestran ejemplos de regiones de alineamientos múltiples de secuencias que incluyen las cisteínas conservadas.

Se realizó análisis adicional de alineamientos múltiples de secuencias y de árboles filogenéticos para identificar residuos (distintivos) específicos de DHAD para distinguir DHAD de las arabonato deshidratasa y otras ácido aldónico deshidratasa. Entre las secuencias que contienen las tres cisteínas conservadas especificadas, se encontró que un clado de 274 secuencias contenía las DHAD de *S. mutans* y *L. lactis*. La arabonato deshidratasa de *A. brasiliense* se encontró en un clado separado de 195 secuencias. Se analizaron alineamientos múltiples de secuencias que contenían las secuencias del grupo de DHAD de 274, el grupo de ácido aldónico deshidratasa y la rama de "[4Fe-4S] DHAD" para residuos conservados en cada posición. Se detectó un conjunto de residuos que están conservados en la mayoría de ambos de DHAD, pero no en el grupo de ácido aldónico deshidratasa, y se muestra en la Tabla 4. Adicionalmente, también se encontraron residuos que están conservados en las ácido aldónico deshidratasa, pero no en ninguno de los dos grupos de DHAD. Tales residuos diferencialmente conservados pueden actuar de determinantes de la especificidad del sustrato en sus enzimas respectivas.

Tabla 4. Residuos conservados* que discriminan DHAD de ácido aldónico deshidratasa

Posición*	[4Fe-4S] DHAD	Grupo de DHAD- 274	Ácido aldónico deshidratasa
88	Asp	Asp	Glu
113	NC**	NC	Glu
142	Arg	Arg o Asn	NC
165	NC	NC	Gly
208	Asn	Asn	NC
454	Leu	Leu	NC
477	Phe	Phe o Tyr	NC
487	Gly	Gly	NC
Residuo(s) conservado(s) en >90 % de la mayoría de los representantes.			
*La numeración de la posición está basada en la posición en la DHAD de <i>S. mutans</i>			
** No conservado			

El grupo de DHAD que forma el clado de 274 secuencias que no incluye DHAD de *E. coli* de conglomerado [4Fe-4S], fosfogluconato deshidratasa de *Z. mobilis* de conglomerado [4Fe-4S], o supuestamente la arabonato deshidratasa de *A. brasiliense* de conglomerado [4Fe-4S], se identificó diferencialmente de los otros grupos por filogenia y los residuos conservados se encontraron en alineamientos múltiples de secuencias como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con la propuesta de que el grupo incluye DHAD de conglomerado de [2Fe-2S], la DHAD de *Arabidopsis thaliana* y la DHAD de *S. solfataricus* son parte del grupo. Debido a que *Arabidopsis thaliana* es una planta como la espinaca, y la DHAD de espinaca se ha identificado como una DHAD de conglomerado [2Fe-2S] (Flint y Emptage

(1988) J. Biol. Chem. 263:3558-3564), la DHAD de *Arabidopsis thaliana* puede ser una DHAD de conglomerado de [2Fe-2S]. Se informa que la DHAD de *S. solfataricus* es resistente al oxígeno como la DHAD de conglomerado de [2Fe-2S] de espinaca (Kim y Lee (2006) J. Biochem. 139, 591-596), que es una indicación de que la DHAD de *S. solfataricus* puede ser una DHAD de conglomerado de [2Fe-2S].

- 5 El clado de 274 secuencias está marcado en la Figura 4 como “2Fe-2S DHAD”. 193 de estas secuencias son de fuentes bacterianas. Las tres cisteínas conservadas y los residuos conservados especificados en la Tabla 4 pueden identificarse en alineamientos múltiples de secuencias de las 193 DHAD bacterianas, empleando el procedimiento de alineamiento descrito anteriormente. Las secuencias de las 193 [2Fe-2S] DHAD bacterianas se proporcionan en el listado de secuencias y las SEC ID N° se enumeran en la Tabla 2a.
- 10 Dentro del grupo de [2Fe-2S] DHAD, las identidades de varias proteínas bacterianas se han confirmado por análisis funcional como DHAD, que se describe en otros ejemplos en el presente documento. Otros ejemplos en el presente documento muestran que las proteínas en este grupo, tales como la DHAD de *S. mutans* y DHAD de *L. lactis*, contienen un conglomerado de [2Fe-2S].

Preparación del perfil HMM

- 15 Siete DHAD bacterianas que se identificaron como miembros del grupo filogenético de [2Fe-2S] se expresaron en *E. coli* y se encontró actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa como se describe en el Ejemplo 2 más adelante. Estas DHAD son de *Nitrosomonas europaea* (SEC ID N°: 310), *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEC ID N°: 298), *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168), *Streptococcus thermophilus* (SEC ID N°: 164), *Ralstonia metallidurans* (SEC ID N°: 346), *Ralstonia eutropha* (SEC ID N°: 344) y *Lactococcus lactis* (SEC ID N°: 232). Además, se encontró
- 20 que la DHAD de *Flavobacterium johnsoniae* (SEC ID N°: 230) tenía actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa cuando se expresó en *E. coli*. Las secuencias de aminoácidos de estas DHAD bacterianas funcionales experimentalmente determinadas se analizaron usando el paquete de software HMMER (la teoría tras los perfiles HMM se describe en R. Durbin, S. Eddy, A. Krogh y G. Mitchison, Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids, Cambridge University Press, 1998; Krogh y col., 1994; J. Mol. Biol. 235:1501-1531), siguiendo la guía de usuario que está disponible de HMMER (Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA). La salida del programa de software HMMER es un perfil modelo oculto de Markov (HMM) que caracteriza las secuencias de entrada. Como se ha establecido en la guía de usuario, el perfil d HMM son modelos estadísticos de alineamientos múltiples de secuencias. Capturan información específica de la posición sobre cómo de conservada está cada columna del
- 25 alineamiento y qué residuos de aminoácidos son lo más probables que se produzcan en cada posición. Así, los HMM tienen una base probabilística formal. Los perfiles HMM para un gran número de familias de proteínas están públicamente disponibles en la base de datos PFAM Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA).
- 30

El perfil HMM se construyó como sigue:

Etapa 1. Construcción de un alineamiento de secuencias

- 35 Las ocho secuencias para las DHAD funcionalmente verificadas enumeradas anteriormente se alinearon usando Clustal W con parámetros por defecto.

Etapa 2. Construcción de un perfil HMM

- 40 Se ejecutó el programa hmmbuild en el conjunto de secuencias alineadas usando parámetros por defecto. hmmbuild lee el archivo de alineamiento múltiple de secuencias, construye un nuevo perfil HMM y guarda el perfil HMM en el archivo. Usando este programa se generó un perfil no calibrado de los alineamientos múltiples para cada conjunto de secuencias de subunidad descritas anteriormente.

- 45 La siguiente información basada en la guía de usuario del software HMMER da alguna descripción de la forma en la que el programa hmmbuild prepara un perfil HMM. Un perfil HMM puede modelar alineamientos con huecos, por ejemplo, que incluyen inserciones y deleciones, que permite que el software describa un dominio conservado completo (en vez de solo un pequeño dominio con huecos). Las inserciones y deleciones se modelan usando estados de inserción (I) y estados de deleción (D). Todas las columnas que contienen más de una cierta fracción x de caracteres de hueco se asignarán como una columna de inserción. Por defecto, x se fija a 0,5. Cada estado de coincidencia tiene un estado de I y D asociado a él. HMMER llama a un grupo de tres estados (M/D/I) en la misma posición consenso en el alineamiento un “nodo”. Estos estados están conectados entre sí con flechas denominadas *probabilidades de transición de estados*. Los estados M y I son emisores, mientras que los estados D son silenciosos. Las transiciones se disponen de manera que en cada nodo tanto se use el estado M (y un residuo está alineado y puntuado) como se use el estado D (y ningún residuo está alineado, produciendo un carácter de hueco de deleción, '-'). Las inserciones se producen entre nodos, y los estados I tienen una transición propia, permitiendo que se produzcan uno o más residuos insertados entre columnas consenso.

- 55 Las puntuaciones de residuos en un estado coincidente (es decir, puntuaciones de emisión de estado coincidente), o en un estado insertado (es decir, puntuaciones de emisión de estado insertado) son proporcionales a $\text{Log}_2(p_x) / (\text{null}_x)$. En la que p_x es la probabilidad de que un residuo de aminoácido, en una posición particular en el alineamiento, según el perfil HMM y null_x es la probabilidad según el modelo Null. El modelo Null es un modelo

probabilístico de un estado simple con conjunto precalculado de probabilidades de emisión para cada uno de los 20 aminoácidos derivados de la distribución de aminoácidos en la publicación 24 de SWISSPROT.

Las puntuaciones de transición de estados también se calculan como parámetros de logaritmos de las probabilidades y son proporcionales a $\text{Log}_2(t_x)$. En la que t_x es la probabilidad de pasar a un estado emisor o no emisor.

Etapa 3. Calibrar el perfil HMM

El perfil HMM se leyó usando `hmmcalibrate` que puntúa un gran número de secuencias aleatorias sintetizadas con el perfil (el número por defecto de secuencias de sintéticas usadas es 5.000), se ajusta a una distribución de valores extremos (EVD) en el histograma de aquellas puntuaciones y vuelve a guardar el archivo de HMM ahora que incluye los parámetros de EVD. Estos parámetros de EVD (μ y λ) se usan para calcular los valores de E de puntuaciones de bit cuando el perfil se busca por comparación con una base de datos de secuencias de proteínas. `hmmcalibrate` escribe dos parámetros en el archivo HMM sobre una línea marcada "EVD": estos parámetros son los parámetros μ (localización) y λ (escala) de una distribución de valores extremos (EVD) que se ajusta mejor a un histograma de puntuaciones calculadas en secuencias generadas aleatoriamente de aproximadamente la misma longitud y composición de residuos que SWISS-PROT. Esta calibración se hizo una vez para el perfil HMM.

El perfil HMM calibrado para el conjunto de secuencias de DHAD se proporciona en la Tabla 1. El perfil HMM se proporciona en un diagrama que da la probabilidad de que cada aminoácido se produzca en cada posición en la secuencia de aminoácidos. La mayor probabilidad está resaltada para cada posición. La primera línea para cada posición informa de las puntuaciones de emisión coincidentes: probabilidad de que cada aminoácido esté en ese estado (se resalta la mayor puntuación). La segunda línea informa de las puntuaciones de emisión insertadas y la tercera línea informa de las puntuaciones de transiciones de estados: M→M, M→I, M→D; I→M, I→I; D→M, D→D; B→M; M→E.

Por ejemplo, el perfil HMM de DHAD muestra que la metionina tiene una probabilidad de 1757 de estar en la primera posición, la mayor probabilidad que está resaltada. En la segunda posición, el ácido glutámico tiene la mayor probabilidad, que es 1356. En la tercera posición, la lisina tiene la mayor probabilidad, que es 1569.

Etapa 4. Prueba de la especificidad y sensibilidad de los perfiles HMM construidos

El perfil HMM se evaluó usando `hmmsearch`, que lee un perfil HMM de `hmmfile` y busca un archivo de secuencias para coincidencias de secuencias significativamente similares. El archivo de secuencias buscado contuvo 976 secuencias (véase anteriormente). Durante la búsqueda, el tamaño de la base de datos (parámetro Z) se fijó a 1 billón. Este parámetro de tamaño garantiza que valores de E significativos contra la actual base de datos seguirán siendo significativos en el futuro predecible. El corte del valor E se fijó en 10.

Una búsqueda `hmmsearch` con el perfil HMM generado del alineamiento de las ocho DHAD con función experimentalmente verificada coincidió con todas las 976 secuencias con un valor de $E < 10^{-5}$. Este resultado indica que los miembros de la superfamilia de deshidratasas comparten similitud de secuencias significativa. Se usó una búsqueda `hmmsearch` con un corte de valor de $E 10^{-5}$ para separar deshidratasas relacionadas con DHAD de otras proteínas más remotas, pero relacionadas, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Expresión y caracterización de [2Fe-2S] dihidroxi-ácido deshidratasas bacterianas en *E. coli*

Las regiones codificantes de *ilvD* de diferentes bacterias, que a partir del análisis filogenético descrito en el Ejemplo 1 están en el grupo [2Fe-2S], se expresaron bajo el control del promotor T7 en el vector pET28a (Novagen) en *E. coli*. Cada región codificante de *ilvD* se amplificó con un cebador directo específico con un sitio de restricción NheI y un cebador inverso específico con un sitio de restricción NotI (enumerados en la Tabla 5).

Tabla 5. SEC ID N° de cebadores usados para PCR de regiones codificantes de DHAD de los organismos enumerados

Organismo	Cebador directo SEC ID N°	Cebador inverso SEC ID N°
Nitrosomonas europaea ATCC 19718	424	401
Synechocystis sp. PCC 6803	399	400
Streptococcus mutans UA159 (ATCC 700610)	435	436
Streptococcus thermophilus LMG 18311	395	396

Ralstonia metallidurans CH34	404	405
Ralstonia eutropha H16 (ATCC 17699)	406	407
Lactococcus lactis	420	421

Se usó el ADN genómico de cada cepa bacteriana como molde. Se preparó ADN genómico a partir de cada cepa enumerada en la Tabla 1 usando un kit de purificación de ADN MasterPure (Epicentre, Madison, WI). El vector plasmídico se amplificó con los cebadores pET28a-F(NotI) (SEC ID N°: 397) y pET28a-R(NheI) (SEC ID N°: 398) para eliminar la región de la marca his. Tanto los fragmentos de gen como de plásmido se digirieron con NheI y NotI antes de la ligación. La mezcla de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* (Top 10) (Invitrogen). Los transformantes se cultivaron en placas de LB-agar complementado con 50 µg/ml de kanamicina. Los clones positivos que se confirmaron por secuenciación se transformaron en la cepa Tuner (DE3) de *E. coli* (Novagen) para la expresión. Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio líquido de LB complementado con kanamicina a 30 °C. La inducción se llevó a cabo añadiendo 0,5 mM de IPTG cuando el cultivo de *E. coli* alcanzó una DO de 0,3 a 0,4 a 600 nm. El cultivo se recogió después de 5 horas de inducción. Los sedimentos de células se lavaron con tampón Tris (pH 8,0).

La actividad enzimática del extracto en bruto se ensayó a 37 °C del siguiente modo. Las células que iban a ensayarse para DHAD se suspendieron en 2-5 volúmenes de Tris 50 mM, MgSO₄ 10 mM, tampón a pH 8,0 (TM8), luego se rompieron por sonicación a 0 °C. El extracto en bruto de las células rotas se centrifugó para sedimentar los residuos celulares. Los sobrenadantes se eliminaron y se guardaron sobre hielo hasta que se ensayaron (el ensayo inicial fue en el plazo de 2 h desde la rotura de las células). Se encontró que las DHAD ensayadas en el presente documento fueron estables en extractos en bruto mantenidos sobre hielo durante algunas horas. La actividad también se preservó cuando pequeñas muestras se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C.

Los sobrenadantes se ensayaron usando el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina como se describe en Flint y Emptage (J. Biol. Chem. (1988) 263: 3558-64). Cuando la actividad fue tan alta que fue necesario diluir el extracto en bruto para obtener un ensayo preciso, la dilución se hizo en 5 mg/ml de BSA en TM8.

Los ensayos de proteína se realizaron usando el reactivo Pierce Better Bradford (cat 23238) usando BSA como patrón. Se hicieron diluciones para ensayos de proteína en tampón TM8 cuando fue necesario.

Todas las DHAD fueron activas cuando se expresaron en *E. coli*, y las actividades específicas se facilitan en la Tabla 6. La DHAD de *Streptococcus mutans* tuvo la mayor actividad específica.

Tabla 6. Actividades de [2Fe-2S] DHAD bacterianas en *E. coli*

Fuente de organismo de DHAD	SEC ID N° de secuencia codificante de DHAD	Actividad específica (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Nitrosomonas europaea ATCC 19718	309	3,3
Synechocystis sp. PCC 6803	297	3,5
Streptococcus mutans UA159 (ATCC 700610)	167	7,9
Streptococcus thermophilus LMG 18311	163	6,6
Ralstonia metallidurans CH34	404	2,4
Ralstonia eutropha H16 (ATCC 17699)	406	4,1
Lactococcus lactis	231	2,1
Control de vector	N/A	0,07

Ejemplo 3

30 Purificación y caracterización de DHAD de *Streptococcus mutans* expresado en *E. coli*

La DHAD de *S. mutans* se purificó adicionalmente y se caracterizó. Para la purificación de la DHAD de *S. mutans*, seis litros de cultivo de la cepa Tuner de *E. coli* que aloja el plásmido pET28a con ilvD de *S. mutans* se cultivaron y se indujeron con IPTG. La enzima se purificó rompiendo las células, como se describe en el Ejemplo 2, en un tampón Tris 50 mM a pH 8,0 que contenía MgCl₂ 10 mM (tampón TM8), centrifugando para eliminar el residuo de células, luego cargando el sobrenadante del extracto en bruto sobre una columna de Q Sepharose (GE Healthcare)

y eluyendo la DHAD con una concentración creciente de NaCl en tampón TM8. Las fracciones que contienen la DHAD basadas en la aparición de color (el color parduzco es debido a la presencia del conglomerado de Fe-S) se reunieron y se cargaron sobre una columna Sephacryl S-100 (GE Healthcare) y se eluyeron con tampón TM8. Como se juzga por geles de SDS, se estimó que la pureza de la proteína eluida de la columna Sephacryl era del 60-80 %.

5 La actividad de la enzima parcialmente purificada se ensayó a 37 °C como se describe por Flint y col. (J. Biol. Chem. (1988) 263(8): 3558-64). La actividad específica de la proteína purificada fue 40 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Se estimó que la k_{cat} para la enzima purificada era 50-70 s^{-1} .

Se estudió la estabilidad de la DHAD purificada en aire incubando la enzima purificada a 23 °C durante diversos intervalos de tiempo en presencia de aire ambiente, seguido de un ensayo de actividad como se ha descrito anteriormente. La actividad de la DHAD de *Streptococcus mutans*, a diferencia de DHAD purificada similarmente de *E. coli*, fue estable incluso después de 72 horas de incubación como se muestra en la Figura 4, en la que (A) muestra resultados de la DHAD de *S. mutans* y (B) muestra resultados de la DHAD de *E. coli*.

El espectro de UV-visible de *S. mutans* purificado se muestra en la Figura 5. El número de picos por encima de 300 nm es típico de proteínas con conglomerados de [2Fe-2S]. La DHAD de *S. mutans* se redujo con ditionito de sodio y los espectros de EPR se obtuvieron a temperaturas variables. La Figura 6 muestra espectros medidos a temperaturas entre 20 K y 70 K. Que el espectro de EPR de *S. mutans* sea medible hasta 70 K es indicativo de que contiene un conglomerado de [2Fe-2S]. Es muy conocido, por ejemplo, que los espectros de proteínas de EPR que contienen conglomerados [4Fe-4S] no son observables a temperaturas muy por encima de 10 K (véase, por ejemplo, Rupp y col., Biochimica et Biophysica Acta (1978) 537:255-269).

20 Ejemplo 4

Construcción de casetes de expresión de dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD) para *Lactobacillus plantarum*

El fin de este ejemplo es describir cómo clonar y expresar un gen dihidroxi-ácido deshidratasa (*ilvD*) de diferentes fuentes bacterianas en *Lactobacillus plantarum* PN0512 (ATCC PTA-7727). Se usó un vector lanzadera pDM1 (SEC ID N°: 410) para la clonación y expresión de genes *ilvD* de *Lactococcus lactis subsp lactis* NCDO2118 (NCIMB 702118) [Godon y col., J. Bacteriol. (1992) 174:6580-6589] y *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) en *L.*

plantarum PN0512. El plásmido pDM1 contiene un replicón pLF1 mínimo (~0,7 Kbp) y toxina-antitoxina (TA) pemK-

pemI del plásmido pLF1 de *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, un replicón P15A de pACYC184, marcador de cloranfenicol para la selección en tanto *E. coli* como *L. plantarum* y promotor sintético P30 [Rud y col., Microbiology (2006) 152:1011-1019]. El plásmido pLF1 (C.-F. Lin y col., n° de acceso de GenBank AF508808) está estrechamente relacionado con el plásmido p256 [Sørvig y col., Microbiology (2005) 151:421-431], cuyo número de copias se estimó

que era ~5-10 copias por cromosoma para *L. plantarum* NC7. Se derivó un promotor sintético P30 de promotores de

ARNr de *L. plantarum* que son conocidos por estar entre los promotores más fuertes en bacterias ácido lácticas (LAB) [Rud y col., Microbiology (2005) 152:1011-1019].

La región codificante de *ilvD* de *Lactococcus lactis* (SEC ID N°: 231) se amplificó por PCR de ADN genómico de *Lactococcus lactis subsp lactis* NCDO2118 con los cebadores 3T-*ilvDLI*(BamHI) (SEC ID N°: 408) y 5B-*ilvDLI*(NotI) (SEC ID N°: 409). Se preparó ADN genómico de *L. lactis subsp lactis* NCDO2118 con un kit Puregene Gentra (QIAGEN, CA). El producto de PCR (*ilvDLI*) de *ilvD* de *L. lactis* de 1,7 Kbp se digirió con NotI y se trató con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa para hacer romos los extremos. El fragmento de la región codificante de *ilvD* de *L. lactis* resultante se digirió con BamHI y se purificó en gel usando un kit de extracción en gel QIAGEN (QIAGEN, CA). El plásmido pDM1 se digirió con ApaI, se trató con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa para hacer romos los extremos y luego se digirió con BamHI. El fragmento de la región codificante de *ilvD* de *L. lactis* purificado en gel se ligó en los sitios BamHI y ApaI (romo) del plásmido pDM1. La mezcla de ligación se transformó en células Top10 de *E. coli* (Invitrogen, CA). Los transformantes se sembraron para la selección sobre placas de LB-cloranfenicol. Los clones positivos se cribaron por digestión con Sall, dando un fragmento con un tamaño esperado de 5,3 Kbp. Los clones positivos se confirmaron adicionalmente por secuenciación de ADN. El clon correcto se llamó pDM1-*ilvD* (*L. lactis*).

La región codificante de *ilvD* de *S. mutans* UA159 (ATCC 700610) del plásmido pET28a se clonó en el plásmido pDM1. La construcción de pET28a que contiene *ilvD* de *S. mutans* se describió en el Ejemplo 2. El plásmido pET28a que contiene *ilvD* de *S. mutans* se digirió con XbaI y NotI, se trató con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa para hacer romos los extremos, y un fragmento de 1.759 pb que contiene la región codificante de *ilvD* de *S. mutans* se purificó en gel. El plásmido pDM1 se digirió con BamHI, se trató con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa para hacer romos los extremos y luego se digirió con PvuII. El fragmento purificado en gel que contiene la región

codificante de *ilvD* de *S. mutans* se ligó en los sitios BamHI (romo) y PvuII del plásmido pDM1. La mezcla de ligación se transformó en células Top10 de *E. coli* (Invitrogen, CA). Los transformantes se sembraron en placa para la selección sobre placas de LB-cloranfenicol. Los clones positivos se cribaron por digestión con ClaI, dando un fragmento con un tamaño esperado de 5,5 Kbp. El clon correcto se llamó pDM1-*ilvD* (*S. mutans*).

5 Ejemplo 5

Medición de la actividad de DHAD expresada en *L. plantarum* PN0512

Se transformó *L. plantarum* PN0512 con el plásmido pDM1-*ilvD* (*L. lactis*) o pDM1-*ilvD* (*S. mutans*) por electroporación. Se prepararon células electro-competentes por el siguiente procedimiento. Se inocularon 5 ml de medio MRS de lactobacilos que contiene 1 % de glicina con células PN0512 y se cultivaron durante la noche a 30 °C. Se inocularon 100 ml de medio MRS con 1 % de glicina con el cultivo durante la noche a una DO600 = 0,1 y se cultivaron a una DO600 = 0,7 a 30 °C. Las células se recogieron a 3700 x g durante 8 min a 4 °C, se lavaron con 100 ml de MgCl₂ 1 mM frío, se centrifugaron a 3700 x g durante 8 min a 4 °C, se lavaron con 100 ml de 30 % de PEG-1000 frío (81188, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se recentrifugaron a 3700 x g durante 20 min a 4 °C, luego se

resuspendieron en 1 ml de 30 % de PEG-1000 frío. Se mezclaron 60 µl de células electro-competentes con ~100 ng

de ADN de plásmido en una cubeta de electroporación de 1 mm de hueco fría y se electroporaron en un pulsador BioRad Gene (Hercules, CA) a 1,7 kV, 25 µF y 400 Ω. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio MRS que contenía sacarosa 500 mM y MgCl₂ 100 mM, se incubaron a 30 °C durante 2 h y luego se sembraron sobre placas de medio MRS que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol.

Transformantes de *L. plantarum* PN0512 que llevan pDM1-*ilvD* (*L. lactis*) o pDM1-*ilvD* (*S. mutans*), además de transformantes de control con el vector pDM1 solo, se cultivaron durante la noche en medio MRS de lactobacilos a 30 °C. Se inocularon 120 ml de medio MRS complementado con MOPS 100 mM (pH 7,5), citrato férrico 40 µM, L-cisteína 0,5 mM y 10 µg/ml de cloranfenicol con cultivo durante la noche a una DO600 = 0,1 en un matraz de tapa roscada de 125 ml, para cada muestra durante la noche. Los cultivos se incubaron anaeróbicamente a 37 °C hasta que alcanzaron una DO600 de 1-2. Los cultivos se centrifugaron a 3700 x g durante 10 min a 4 °C. Los sedimentos se lavaron con tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 6,2 (6,2 g/l de KH₂PO₄ y 1,2 g/l de K₂HPO₄) y se recentrifugaron. Los sedimentos se congelaron y se guardaron a -80 °C hasta que se ensayaron para actividad de DHAD. Se ensayaron muestras de extracto celular para la actividad de DHAD usando un método basado en dinitrofenilhidracina como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados de la actividad de DHAD se facilitan en la Tabla 7. La actividad específica de DHAD de *L. lactis* y DHAD de *S. mutans* en *L. plantarum* PN0512 mostró 0,02 y 0,06 µmol min⁻¹ mg⁻¹, respectivamente, mientras que la muestra de control de vector no mostró actividad detectable.

Tabla 7. Actividad de DHAD en *L. plantarum* PN0512

Fuente de DHAD	Plásmido	Actividad específica (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Control de vector	pDM1	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> NCDO2118	pDM1- <i>ilvD</i> (<i>L. lactis</i>)	0,02
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	pDM1- <i>ilvD</i> (<i>S. mutans</i>)	0,06

Ejemplo 6

Expresión de dihidroxi-ácido deshidratasa de *S. mutans* en levadura

Se usó el vector lanzadera pRS423 FBA *ilvD* (Strep) (SEC ID N°: 430) para la expresión de DHAD de *Streptococcus mutans*. Este vector lanzadera contuvo un origen de replicación F1 (1423 a 1879) para el mantenimiento en *E. coli* y un origen de 2 micrómetros (nt 8082 a 9426) para la replicación en levadura. El vector tiene un promotor FBA (nt 2111 a 3108; SEC ID N°: 425) y terminador FBA (nt 4861 a 5860). Además, lleva el marcador His (nt 504 a 1163) para la selección en levadura y marcador de resistencia a ampicilina (nt 7092 a 7949) para la selección en *E. coli*. La región codificante de *ilvD* (nt 3116 a 4828) de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) está entre el promotor FBA y el terminador FBA formando un gen quimérico para la expresión.

Para probar la expresión de la DHAD de *Streptococcus mutans* en la cepa de levadura BY4741 (conocida en la técnica y obtenible de ATCC n° 201388), el vector de expresión pRS423 FBA *ilvD* (Strep) se transformó en combinación con el vector vacío pRS426 en células BY4741 (obtenibles de ATCC, n° 201388). Los transformantes se cultivaron sobre medio sintético que carecía de histidina y uracilo (Teknova). El crecimiento sobre medio líquido

para el ensayo se llevó a cabo añadiendo 5 ml de un cultivo durante la noche en 100 ml de medio en un matraz de 250 ml. Los cultivos se recogieron cuando alcanzaron 1 a 2 de DO a 600 nm. Las muestras se lavaron con 10 ml de Tris 20 mM (pH 7,5) y luego se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón Tris. Las muestras se transfirieron a tubos de 2,0 ml que contenían 0,1 mm de sílice (Lysing Matrix B, MP biomedical). Entonces, las células se rompieron en un disruptor de perlas (BIO101). El sobrenadante se obtuvo por centrifugación en una microcentrífuga a 13.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Normalmente se usaron 0,06 a 0,1 mg de proteína de extracto en bruto en el ensayo de DHAD a 37 °C como se describe por Flint y Emptage (J. Biol. Chem. (1988) 263(8): 3558-64) usando dinitrofenilhidracina. La deshidratasa de *Streptococcus mutans* tuvo una actividad específica de 0,24 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ cuando se expresó en levadura. Una cepa de control que contiene los vectores vacíos pRS423 y pRS426 tuvo un ruido de fondo de la actividad en el intervalo de 0,03 a 0,06 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Ejemplo 7

Expresión del gen *ilvD* de *L. lactis* en levadura

La región codificante de *ilvD* de *L. lactis* se amplificó con el cebador directo *ilvD*(LI)-F (SEC ID N°: 420) y el cebador inverso *ilvD*(LI)-R (SEC ID N°: 421). El fragmento amplificado se clonó en el vector lanzadera pNY13 por reparación de huecos. pNY13 (SEC ID N°: 437) se derivó de pRS423. Este vector lanzadera contuvo un origen de replicación F1 (1423 a 1879) para el mantenimiento en *E. coli* y un origen de 2 micrómetros (nt 7537 a 8881) para la replicación en levadura. El vector tiene un promotor FBA (nt 2111 a 3110) y terminador FBA (nt 4316 a 5315). Además, lleva el marcador His (nt 504 a 1163) para la selección en levadura y marcador de resistencia a ampicilina (nt 6547 a 7404) para la selección en *E. coli*.

Los clones positivos se seleccionaron basándose en la amplificación con los cebadores directos e inversos para la región codificante de *ilvD* y adicionalmente se confirmaron por secuenciación. La nueva construcción se designó pRS423 FBA *ilvD* (*L. lactis*). Esta construcción se transformó en la cepa de levadura BY4743 (Δ LEU1) (Open Biosystems, Huntsville, AL; Catálogo n° YSC1021-666629) junto con el vector vacío pRS426 como se describe en el Ejemplo 6. El crecimiento y el ensayo de cepas de levadura que contienen el vector de expresión también se llevaron a cabo según los procedimientos como se describen en el Ejemplo 6. Se determinó que la actividad de dihidroxi-ácido deshidratasa en cepas de levadura con el gen *ilvD* de *L. lactis* estaba en el intervalo de 0,05 a 0,17 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Esta actividad fue ligeramente superior al control. Se llevaron a cabo experimentos de complementación para investigar la expresión de esta DHAD y las DHAD de otras bacterias (Ejemplo 8).

Ejemplo 8

Complementación de la cepa de delección *ILV3* de levadura con DHAD bacterianas

La enzima DHAD endógena de *S. cerevisiae* está codificada por el gen *ILV3* y la proteína se dirige a las mitocondrias. La delección de este gen produce la pérdida de actividad endógena de DHAD y proporciona una cepa de prueba en la que la expresión de actividad de DHAD citosólica heteróloga puede evaluarse fácilmente. La delección de *ILV3* produce una incapacidad de la cepa para crecer en ausencia de aminoácidos de cadena ramificada. Se ensayó la expresión de diferentes DHAD bacterianas determinando su capacidad para complementar la cepa de delección de *ILV3* de levadura de forma que se cultivara en ausencia de aminoácidos de cadena ramificada.

Se construyeron vectores lanzadera de expresión que contienen secuencias del gen *ilvD* que codifican DHAD de las bacterias enumeradas en la Tabla 8. Los elementos básicos de estas construcciones de expresión fueron los mismos que los del vector pRS423 FBA *ilvD* (Strep) descrito en el Ejemplo 6. Cada una de las regiones codificantes de *ilvD* se preparó por PCR como se describe en el Ejemplo 2 y se clonó para sustituir la región codificante de *ilvD* de *Streptococcus mutans* en pRS423 FBA *ilvD* (Strep) creando los plásmidos enumerados en la Tabla 8. Estas construcciones de expresión se transformaron en la cepa de delección de *ILV3*, BY4741 *ilv3::URA3*, y se preparó del siguiente modo. Se construyó un casete de disrupción *ilv3::URA3* por amplificación por PCR del marcador *URA3* de pRS426 (ATCC n° 77107) con cebadores "ILV3::URA3 F" y "ILV3::URA3 R", facilitados como SEC ID N°: 431 y 432. Estos cebadores produjeron un producto de PCR *URA3* de 1,4 kb que contuvo extensiones de 5' y 3' de 70 pb idénticas a las secuencias en la dirección 5' y en la dirección 3' del sitio cromosómico de *ILV3* para la recombinación homóloga. El producto de PCR se transformó en células BY4741 (ATCC 201388) usando técnicas genéticas convencionales (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pág. 201-202) y los transformantes resultantes se mantuvieron sobre medio completo sintético que carecía de uracilo y complementado con 2 % de glucosa a 30 °C. Los transformantes se cribaron por PCR usando los cebadores "ILV3 F Check" y "URA3 REV Check", facilitados como SEC ID N°: 433 y 434, para verificar la integración en el sitio correcto y alteración del sitio de *ILV3* endógeno.

Los transformantes con DHAD bacterianas en la Tabla 8 se seleccionaron sobre placas con medio sintético de levadura que carecía de histidina. Entonces, las colonias seleccionadas se aplicaron en parches sobre placas que carecían de valina, leucina e isoleucina. Las cepas que contienen los vectores de expresión enumerados en la Tabla 8 pudieron crecer sobre estas placas que carecían de los aminoácidos de cadena ramificada, aunque no la cepa de control con el plásmido de control. Este resultado indicó que las DHAD de estas bacterias se expresaron

activamente en *S. cerevisiae*.

Tabla 8. DHAD bacterianas probadas y vectores de expresión

Fuente de organismo de DHAD	SEC ID N° de secuencia de ácidos nucleicos de DHAD	Designación del vector
Nitrosomonas europaea ATCC 19718	309	pRS423 FBA ilvD (europ)
Synechocystis sp. PCC 6803	297	pRS423 FBA ilvD (Synech)
Streptococcus thermophilus LMG 18311	163	pRS423 FBA ilvD (thermo)
Ralstonia eutropha H16 (ATCC 17699)	406	pRS423 FBA ilvD (H16)
Lactococcus lactis	231	pRS423 FBA ilvD (L. lactis)

Ejemplo 9

5 Purificación y caracterización de DHAD de *Lactococcus lactis* expresado en *E. coli*

La DHAD de *L. lactis* se purificó y se caracterizó. Para la purificación de DHAD de *L. lactis*, 14 litros de cultivo de la cepa Tuner (DE3) de *E. coli* (Novagen) que aloja el plásmido pET28a que contiene ilvD de *L. lactis* se cultivaron y se indujeron con IPTG. La enzima se purificó rompiendo las células, como se describe en el Ejemplo 2, en 120 ml de tampón Tris 50 mM a pH 8,0 que contenía MgCl₂ 10 mM (tampón TM8), centrifugando para eliminar residuos celulares, luego cargando el sobrenadante del extracto en bruto sobre una columna de Q Sepharose de 5 x 15 cm (GE Healthcare) y eluyendo la DHAD con una concentración creciente de NaCl en tampón TM8. Se reunieron las fracciones que contenían la DHAD, se hicieron 1 M en (NH₄)₂SO₄ y se cargaron sobre una columna de fenil-Sepharose de 2,6 x 15 cm (GE Healthcare) equilibrada con (NH₄)₂SO₄ 1 M en tampón TM8 y se eluyeron con un gradiente decreciente de (NH₄)₂SO₄. Se reunieron las fracciones que contenían DHAD de la columna de fenil-Sepharose y se concentraron a 10 ml. Éstas se cargaron sobre una columna Superdex-200 de 3,5 x 60 cm (GE Healthcare) y se eluyeron con TM8. Las fracciones que contenían la actividad de DHAD se reunieron, se concentraron y se congelaron como perlas en N₂(l). Como se juzga por geles de SDS, se estimó que la pureza de la proteína eluida de la columna Superdex-200 era > 80 %. La actividad de la enzima se ensayó a 37 °C como se describe por Flint y col. (J. Biol. Chem. (1988) 263(8): 3558-64). La actividad específica de la proteína purificada fue 64 μmol min⁻¹ mg⁻¹ a pH 8 y 37 °C. La k_{cat} para la enzima purificada fue 71 s⁻¹.

Se estudió la estabilidad de la DHAD purificada en aire incubando la enzima purificada a 23 °C durante diversos intervalos de tiempo en presencia de aire ambiente, seguido de un ensayo de actividad como se ha descrito anteriormente. La actividad de la DHAD de *L. lactis* fue casi completamente activa incluso después de 20 horas de incubación en aire como se muestra en la Figura 8.

25 El espectro de UV-visible de *L. lactis* purificado se muestra en la Figura 9. Es característico de proteínas con conglomerados de [2Fe-2S].

Ejemplo 10

Uso de dihidroxi-ácido deshidratasa para construir una ruta para la producción de isobutanol en levadura

30 Se realizan las tres primeras etapas de una ruta biosintética de isobutanol por las enzimas acetolactato sintasa, cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) y dihidroxi-ácido deshidratasa. La acetolactato sintasa está codificada por *alsS*. Los genes KARI se conocen como *ILV5* en levadura o *ilvC* en bacterias. Una vez se forma α-cetoisovalerato (KIV) a partir de piruvato mediante la reacción de estas tres enzimas, puede convertirse adicionalmente en isobutanol en levadura por alcohol deshidrogenasas.

35 Se construyó el vector pLH532 (SEC ID N°: 411) para expresar genes KARI y *alsS*. Este vector se deriva del vector pHR81 basado en 2 MICRÓMETROS. En pLH532, la región codificante de *alsS* de *B. subtilis* (nt 14216 a 15931) estuvo bajo el control del promotor *CUP1* (nt. 15939 a 16386). Hubo dos genes KARI en pLH532: la región codificante de *ilvC* de *P. fluorescens* Pf5 (nt. 10192 a 11208) estuvo bajo el control del promotor *ILV5* de la levadura (nt. 11200 a 12390) y la región codificante de *ILV5* de levadura (nt. 8118-9167) se puso bajo el control del promotor FBA (nt. 7454-8110). El marcador de selección fue *URA3* (nt. 3390 a 4190).

40 El huésped de levadura para la producción de isobutanol fue BY4741

pdC1::FBAP-alsS-LEU2. Esta cepa se construyó del siguiente modo. Primero se construyó el plásmido de expresión pRS426-FBAP-*alsS*. El fragmento de la región codificante de *alsS* de 1,7 kb de pRS426::*GPD::alsS::CYC* se aisló por purificación en gel tras la digestión con *BbvCI* y *Pacl*. Este plásmido tiene un gen quimérico que contiene el promotor *GPD* (SEC ID N°: 439), la región codificante de *alsS* de *Bacillus subtilis* (SEC ID N°: 438) y el terminador *CYC1* (SEC ID N°: 440) y era como se

describe en el Ejemplo 17 de la publicación de patente de EE.UU. n° US20070092957A1. El fragmento ILV5 de plásmido pRS426::FBA::ILV5::CYC, también descrito en el Ejemplo 17 del documento US20070092957, se eliminó por digestión por restricción con *BbvCI* y *PacI* y el fragmento de vector de 6,6 kb restante se purificó en gel. Este vector tiene un gen quimérico que contiene el promotor FBA (SEC ID N°: 425) y el terminador CYC1 que se une a la región codificante del gen ILV5 de *S. cerevisiae* (SEC ID N°: 442). Estos dos fragmentos purificados se ligaron durante la noche a 16 °C y se transformaron en células químicamente competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Los transformantes se obtuvieron sembrando células en medio LB Amp100. La inserción de *alsS* en el vector se confirmó por el patrón de digestión con restricción y PCR (cebadores N98SeqF1 y N99SeqR2, SEC ID N°: 412 y 413).

Se creó un casete de interrupción *pdc1::FBAp-alsS-LEU2* uniendo el segmento *FBAp-alsS* de pRS426-*FBAp-alsS* al gen *LEU2* de pRS425 (ATCC No. 77106) por SOE-PCR (como se describe por Horton y col. (1989) Gene 77:61-68) usando como molde pRS426-*FBAp-alsS* y ADN de plásmidos de pRS425, con ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; catálogo n° F-540S) y cebadores 112590-48A y 112590-30B a D, facilitados como SEC ID N°: 414, SEC ID N°: 415, 416 y 417. Los cebadores externos para SOE-PCR (112590-48A y 112590-30D) contuvieron regiones de 50 pb de 5' y 3' homólogas a las regiones en la dirección 5' y en la dirección 3' del promotor y terminador *PDC1*. El fragmento de PCR del casete completado se transformó en BY4741 (ATCC n° 201388) y los transformantes se mantuvieron sobre medio completo sintético que carecía de leucina y complementado con 2 % de glucosa a 30 °C usando técnicas genéticas convencionales (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pág. 201-202). Los transformantes se cribaron por PCR usando los cebadores 112590-30E y 112590-30F, facilitados como SEC ID N°: 419 y 418, para verificar la integración en el sitio *PDC1* con delección de la región codificante *PDC1*. Los transformantes correctos tienen el genotipo: BY4741*pdc1::FBAp-alsS-LEU2*.

Para probar si DHAD codificada por *ilvD* de *Streptococcus mutans* podría usarse para la biosíntesis de isobutanol, el vector de expresión que contiene este *ilvD*, pRS423 FBA *ilvD*(strep) preparado en el Ejemplo 6, se co-transformó con el vector pLH532 en la cepa de levadura BY4741*pdc1::FBAp-alsS-LEU2*. La preparación de células competentes, transformación y medio de crecimiento para la selección de los transformantes fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 6. Se cultivaron colonias seleccionadas bajo condiciones limitantes de oxígeno en 15 ml de medio en botellas de suero de 20 ml con tapones. Las botellas se incubaron a 30 °C en un agitador con una velocidad constante de 225 rotaciones por minuto. Después de 48 horas de incubación, las muestras se analizaron con HPLC para la presencia de isobutanol. El resultado del análisis de HPLC se muestra en la Figura 7. La presencia de isobutanol se indicó por un pico con un tiempo de retención de 47,533 min. Este resultado mostró que la expresión del gen *ilvD* de *Streptococcus mutans*, junto con la expresión de los genes *alsS* y KARI, condujo a la producción de isobutanol en levadura.

Ejemplo 11

Consulta de bases de datos actualizadas para identificar [2Fe-2S]dihidroxi-ácido deshidratasa adicionales

Se realizó una segunda consulta posterior de la base de datos pública actualizada para descubrir [2Fe-2S] dihidroxi-ácido deshidratasa recientemente secuenciadas. Al 95 % de corte de identidad se generó un conjunto inicial de 1425 secuencias a partir de una consulta de la base de datos como se describe en el Ejemplo 1, "Análisis filogenético". Entonces se ejecutaron alineamientos múltiples de secuencias con ClustalW como se describe en el Ejemplo 1. Las secuencias se analizaron posteriormente para los siguientes residuos conservados en las posiciones correspondientes en la DHAD de *S. mutans*: cisteínas en las posiciones 56, 129 y 201, ácido aspártico en la posición 88, arginina o asparagina en la posición 142, asparagina en la posición 208 y leucina en la posición 454. Además del conjunto original de 193 se identificaron 88 [2Fe-2S] dihidroxi-ácido deshidratasa novedosas de bacterias y se enumeran en la Tabla 2b.

Tabla 1

MER2.0 [2.2g]
 ME dhad_for_hmm
 NG 554
 PH Amino
 P yes

Nombre de programa y versión
 Nombre del archivo de entrada con el alineamiento de las secuencias
 Longitud del alineamiento: incluye indels
 Tipo de residuos
 Mapa de los estados de la concordancia con las columnas del alineamiento

Comandos usados para generar el archivo: esto significa que se aplicó hmmbuild (con los parámetros por defecto) al archivo de alineamiento

M /app/public/hmm/current/bin/hmmbuild -F dhad-exp_hmm dhad_for_hmmaln
 M /app/public/hmm/current/bin/hmmcalibrate dhad-exp_hmm

Comandos usados para generar el archivo: esto significa que se aplicó hmmscalibrate (con los parámetros por defecto) al perfil HMM

EQ 8
 TE Tue Jun 3 10:48:24 2008
 -8455 -4 -1000 -1000 -8455 -4 -8455 -4
 ILT -4 -8455

Número de secuencias en el archivo de alineamiento
 Cuándo se generó el archivo
 La distribución de probabilidad de transición para el modelo Null (estado G único)

La distribución de la probabilidad de emisión del símbolo para el modelo Null (estado G), consiste en K (por ejemplo, 4 6 20) números enteros. La probabilidad de Null usada para convertirlos en probabilidad del modelo es 1/K.
 Los parámetros de distribución de valores extremos μ y λ , respectivamente, ambos valores son de punto flotante. Lambda es positivo y no
 Estos valores se fijan cuando el modelo se calibra con hmmscalibrate.

D:498.650970.0.006142

M	A	C	G	E	F	S	H	I	K	L	R	N	Q	T	S	V	W	Y	Position		
m->m	m->i	m->d	i->m	i->i	d->m	d->d	i->i	b->m	m->e										signature		
-538*		-1684																			
6)	-233	-1296	99	1223	-1477	-1132	89	-1122	420	-1248	1757	1553	-1296	454	-24	-190	-188	-838	-1578	-985	6
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
7)	-220	-1288	232	1365	-1607	1016	-70	-1474	190	-1534	775	132	-1298	300	-282	183	1140	-1092	-1872	-1262	7
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
8)	-446	-1932	1553	653	-2220	-1048	40	-1903	-1589	-1938	-1081	1558	-1319	450	-190	-278	-419	-1552	-2121	-1397	8
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
9)	-404	-498	-1497	-939	-588	-1610	-640	1591	914	-127	335	-682	-1866	-562	-767	-668	-357	-1720	-1169	-753	9
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
10)	-265	-1340	52	1375	-1572	-1189	113	-1125	1343	-1297	-436	99	-1321	505	198	-218	-205	597	-1598	-1032	10
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
11)	256	-397	-1014	-830	-1841	-646	-662	-1443	-767	-1740	-953	-588	-1249	-651	-1007	2267	1588	-862	-2080	-1672	11
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-29	-6203	-7245	-894	-1115	-701	-1378*														
12)	-900	-889	2630	167	513	-2514	-1346	1309	-1767	820	3883	-1898	-2491	-1496	-1799	-1689	-925	150	-836	-1041	12
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-748	-6150	-894	-1115	-701	-1378*														

Tabla 1

5)	588	-1875	-194	-1536	-2188	-1373	-59	-1921	957	-1890	-977	904	292	390	-162	433	-372	-1495	-2370	-1391	13
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
6)	-514	-1116	1207	-315	447	-1650	-304	-778	-224	825	-277	1457	-1738	-123	618	627	-454	-303	-1186	783	14
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7)	-615	-1190	-1360	-922	-904	-1967	-797	-442	-670	381	1700	3009	-2099	-654	-934	-1051	-791	-445	-1490	-979	15
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8)	-1530	-2493	-1722	-855	-3141	-2246	-428	-2627	-2028	-2404	-1656	-927	662	-2	2047	-1421	-1337	-2324	-2357	-2081	16
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9)	-872	-1887	-861	-280	-1369	-1801	1652	-1757	325	-1793	-1031	896	-1876	56	2219	-812	-780	-1514	-1565	-2287	17
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
10)	-630	-1585	-1471	-1089	-2717	-1642	-1010	-2479	-266	-2518	-1746	-1085	-2089	676	1827	2748	-1000	-1368	-2597	-2189	18
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
11)	-851	-2131	-775	-153	-2654	-1735	-211	-2265	1908	-2094	-1244	-386	-1862	-2254	974	1001	-747	-1319	-2181	-1687	19
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
12)	-405	-1259	-618	-100	-1490	-1468	1158	-1121		-1294	-514	578	-1607	85	-433	960	-1849	343	-1677	-1143	20
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
13)	-1772	-1325	-4307	-3677	-1405	-3993	-3383	-2925	-3705	820	-217	-3632	-3761	-3400	-2982	-3260	-1742	2033	-2838	-2525	21
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
14)	-1018	-1329	-2004	-1771	-409	-1993	-1000	-1256	-1512	-1464	-956	-1543	-2387	-1428	-1638	-1257	-2050	-1090	-1012	2448	22
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
15)	-1509	-3055	1070	44	-3310	-1666	-696	-3242	-877	-3158	-2439	-322	-2123	-3562	-1493	-1259	-1550	-2779	-3260	-2448	23
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
16)	-1086	-2199	-2179	-68	-3169	1997	-936	-2974	-948	-2977	-2174	-382	-1980	-589	-1571	1285	-1157	-2369	-3178	-2430	24
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(M)	445	-796	-1082	-521	-641	-1643	-412	-403	-370	-692	2213	-646	536	1196	-698	-630	660	831	-1204	-767	25
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(Q)	741	-990	-1025	-507	-1249	-1551	-519	-720	-357	-1052	-345	-635	-1739	1770	-713	-589	1576	1129	-1559	-1097	26
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(R)	-1753	-2648	-2072	-1047	-3365	-2405	-452	-2782	1989	-2495	-1773	-1082	-2379	2402	2643	-1629	-1506	-2504	-2397	-2190	27
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(S)	-330	-1010	-1820	-1628	-2778	-1229	-1652	-2481	-1592	-2691	-1841	-1273	2130	-1426	-1834	2449	1034	-1716	-2961	-2594	28
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(P)	1882	-1119	-2231	-2302	-3062	-1360	-2209	-2710	-2339	-3013	-2243	-1676	3304	-2117	-2409	-742	-918	-1916	-3263	-3022	29
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(N)	959	-1230	-1066	-915	-2593	-1313	-1196	-2242	-1033	-2447	-1626	3197	-1850	-898	-1392	-582	1155	-1644	-2736	-2256	30
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(R)	-1847	-2640	-2014	-1161	-3282	-2428	-579	-2818	687	-2553	-1869	-1165	-2462	2447	3181	-1746	-1630	-2556	-2447	-2228	31
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(A)	3048	-932	-2480	-2533	-3075	-1200	-2274	-2765	-2501	-3071	-2221	-1658	-1948	-2205	-2512	1225	-739	-1842	-3322	-3078	32
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(M)	-2406	-2296	-3638	-3594	-1525	-3105	-2624	-1047	-3121	-596	5043	-3293	-3425	-3046	-2996	-2611	-2552	-1398	-2513	-2207	33
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(Y)	-1674	-1505	-2863	-2464	596	-2672	2251	-972	-2024	2197	-552	-1996	-2876	-1739	-1988	-1987	-1601	-1002	-95	2332	34
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(Y)	-2013	-2305	-2428	-1781	-328	-2709	-654	-2240	-258	-2054	-1626	-1631	-2768	-899	2789	-2017	-1896	-2130	-857	3434	35
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
(A)	2822	-1031	-2418	-2539	-3226	1898	-2364	-2941	-2626	-3229	-2379	-1722	-2026	-2302	-2634	-654	-848	-1983	-3415	-3226	36
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(I)	-1247	-941	-3559	-3039	-1082	-3101	-2185	2227	-2783	786	-78	-2700	-3050	-2459	-2897	-2253	1322	1974	-1968	-1633	37
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4781	-3953	-4671	-4212	-3320	-5352	-3748	-3778	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	38
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(F)	-1511	-1238	-3511	-3017	-2747	-2992	-1089	-280	-2651	992	2737	-2407	-2904	-2088	-2418	-2099	-1434	-489	-537	-2058	39
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(Q)	-578	-1869	-401	92	-2232	631	-173	-1920	1505	-1913	-1042	-186	-1620	-1658	-51	-482	1346	-1534	-2098	-1493	40
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(U)	-1352	-3096	-3028	1349	-3303	-1566	-724	-3141	1158	-3043	-2267	-168	-1991	-354	-1350	-1036	-1368	-2654	-3227	-2356	41
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(E)	-1507	-3288	2042	-2762	-3520	515	-853	-3401	-981	-3298	-2588	-182	-2064	-503	-1753	-1208	-1553	-2895	-3486	-2547	42
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(D)	-1445	-2778	-3623	-53	-3524	-1590	-1123	-3476	-1367	-3459	-2774	-395	-2156	-825	-2122	554	-1609	-2880	-3582	-2717	43
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(F)	-2658	-2178	-4213	-4000	-3915	-3933	-1352	-531	-3538	1121	-19	-3184	-3709	-2820	-3286	-3219	-2579	-1037	-601	-403	44
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(D)	-684	-2193	-1738	1460	-2494	-437	-249	-2257	1594	-2198	-1308	62	-1637	183	-450	-531	633	-1808	-2374	-1657	45
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(K)	-2620	-2951	-2461	-2048	-3743	-2791	-1570	-3603	-3784	-3387	-2839	-2048	-3039	-1260	-485	-2604	-2536	-3331	-3001	-2888	46
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(P)	1882	-1119	-2251	-2302	-3062	-1360	-2209	-2710	-2339	-3013	-2243	-1676	-3308	-2117	-2409	-742	-918	-1916	-3263	-3022	47
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(I)	-1006	-992	-247	-1784	-650	-2452	-1256	-2372	-1385	77	2213	-1720	-2455	2030	-1490	-1528	-946	106	-1441	-1111	48
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(V)	-177	-1603	-3759	-3888	-2037	-3050	-3221	403	-3473	-1154	-1076	-3246	-3399	-3383	-3437	-2628	-1917	-2538	-2074	-2677	49
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3553	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2638	-2981	-4004	-3668	-4222	50
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(I)	-1759	-1903	-4330	-3968	-1751	-4051	-3743	-3027	-3637	-597	-528	-3729	-3875	-3886	-3910	-3399	-1751	-2438	-3259	-2819	51
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(V)	1736	-1012	-3546	-3076	-1377	-3073	-2494	2052	-2843	-606	-331	-2754	-3122	-2679	-2655	-2270	-1277	-2193	-2333	-1941	52
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(N)	-686	-1511	-702	-806	-2927	-1386	-1339	-2841	-264	-2950	-2137	2702	-1979	-1052	-1648	2444	-971	-2105	-3054	-2475	53
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(M)	-411	-657	-1800	-1434	-1528	1914	-1202	-1029	-1247	-1347	-2989	-1217	-1912	-1119	-1444	-673	1550	-767	-1922	-1539	54
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(W)	-782	-1258	793	-683	1193	346	2051	-932	-556	-1092	-441	-798	-1893	-426	-808	-604	-720	-719	-3163	1546	55
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(W)	1009	-798	-1470	-935	-463	-1773	-545	-460	-751	-738	-58	-943	-1904	-606	-1002	1604	-507	-322	-2535	1521	56
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(D)	-1137	-2711	-2125	1647	-2995	-1523	-617	-2786	-528	-2743	-933	-150	-1897	-234	-165	-624	2117	-2331	-2948	-2141	57
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(I)	-539	-1102	-1031	-629	-1522	1429	-927	-2119	-880	-1369	-699	1692	-1838	-759	-1188	-799	-698	-689	-1887	-1419	58
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(T)	-666	-1412	-954	-984	-2702	-1428	-1357	-2418	-1208	-2650	-1866	2293	-2000	-1101	-1519	-787	-2967	-1835	-2866	-2360	59
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(P)	-632	-1230	-2074	-2144	-2996	-1453	-2116	-2631	-2128	-2926	-2213	-1658	-3670	-2006	-2221	-652	1302	-1931	-3185	-2917	60
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(C)	-2476	-2738	-4102	-4358	-3712	-2761	-3545	-3518	-4167	-3959	-3599	-3631	-3363	-4030	-3832	-2793	-2860	-3158	-3484	-3718	61
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(N)	-2171	-2655	-1453	-1748	-3534	-2364	-2267	-3943	-2365	-3936	-3437	-4236	-2832	-2205	-2608	-2224	-2439	-3392	-3253	-2939	62
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(W)	672	-918	-3119	-2578	-742	-2668	-1734	1807	-2263	16	3713	-2271	-2704	-1960	-2216	-1808	-1058	493	-1612	-1306	63
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(H)	-1525	-2164	-1235	-1346	-2609	2296	4235	-3172	-1516	-3178	-2523	-1448	-2641	-1520	-1780	-1591	-1741	-2356	-2681	-2065	64
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(L)	-2478	-2009	-4717	-4746	-568	-4424	-3262	1334	-3567	-2824	604	-4086	-3672	-3088	-3580	-3717	-2380	-199	-2217	-2207	65
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(H)	-682	-2191	1015	275	-2485	396	2739	-2251	62	-2197	-1307	1826	-1636	1527	-490	-529	-641	-1803	-2375	-1654	66
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(D)	-575	-1320	-1979	134	-2299	94	-242	-2029	114	-2023	-1144	-120	-1608	136	1063	-469	1413	-1305	-2229	-1561	67
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(L)	-2618	-2139	-4997	-4163	2144	-4285	-2334	-83	-3854	-2893	536	-3771	-3806	-2950	-3488	-3583	-2505	-751	-1442	-808	68
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(A)	-2657	-1033	-2403	-2532	-3233	2193	-2364	-2950	-2626	-3237	-2366	-1719	-2027	-2301	-2633	-655	-850	-1988	-3420	-3231	69
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(K)	-443	-1857	958	270	-2158	-1399	-66	-1890	-1639	-442	-957	-36	-1499	1204	-132	615	382	-1469	-2048	-1383	70
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	606	1553	739	-17	-1374	-1488	-182	280	969	-213	-397	-263	-1573	159	69	-426	-33	-761	-1567	-1032	71
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(A)	-2327	-956	-3193	-2728	-1289	-2677	-2114	1664	-2485	-601	-288	-2403	-2839	-2263	-2523	-1871	-1126	1617	-2143	-1766	72
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

K)	-532	-1658	-490	1321	-1891	-1527	-172	-124	2206	-159	-782	-223	-1819	237	-108	-482	-464	-98	-1904	-1326	73
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
H)	384	-1854	835	889	-2165	-1263	1499	-1909	1111	-1866	-948	1091	-1464	421	-131	-284	-342	-59	-2043	-1364	74
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
G)	1825	-932	-2330	-2313	-2120	-2511	-2158	-2885	-2331	-3098	-2209	-1563	-1912	-2032	-2419	1138	-708	-1883	-3328	-3077	75
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
V)	-1760	-1333	-4244	-3789	-1282	-3902	-3150	1495	-3588	1270	96	-3538	-3677	-3236	-3524	-3148	-1725	-2865	-2654	-2373	76
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
W)	-1054	-2172	-1112	-403	-2566	-1917	-286	-2198	2516	-2095	-1292	1183	-1858	140	1333	-959	-922	-1887	-2591	-1720	77
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
D)	611	-1995	1525	937	-2295	-1400	-148	-2043	211	-2078	-1108	-37	-1553	1420	-312	-408	1235	-1639	-2193	-1499	78
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
A)	2716	-902	-2383	-2205	-2759	-1197	-1975	-2459	-2381	-2738	-1895	-1520	-1858	-1844	-2201	1191	1289	-1669	-3045	-2758	79
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
G)	-1709	-2833	2424	-409	-3781	2819	-1457	-3777	-1728	-3733	-3078	-739	-2388	-1180	-2441	-1557	-1893	-3159	-3660	-3038	80
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-212	-2909	-8150	-273	-2634	-701	-1378														
A)	2529	-1119	-2614	-2330	-1245	-1983	-1829	-377	-2042	1435	-341	-1937	-2411	-1873	-2088	-1288	-1059	-387	-2063	-1713	82
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
W)	-472	-361	-2421	-1812	-258	-1979	-826	1164	-1486	-143	2465	973	-2028	-1185	-1426	-1048	412	1116	2999	454	83
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
P)	-1198	-1737	-2187	-2394	-3665	2008	-2550	-3630	-2743	-3758	-3008	-2052	-3474	-2495	-2835	-1401	-1583	-2736	-3511	-3519	84
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
Q)	-999	-1075	-2108	-1563	-728	-2370	-1175	83	-1165	1373	218	-1538	-2400	-2445	-1340	-1445	-946	1441	-1501	-1146	85
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(Q)	-885	-779	-2609	-2013	-481	-2414	-1253	1645	-1736	799	1924	-1827	-2405	-2262	-1752	-1494	-821	802	-1240	-935	86
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(F)	-3342	-2776	-4026	-4232	-4354	-3545	-1431	-2315	-4038	-1801	-1900	-3299	-3760	-3350	-3645	-3490	-3420	-2566	-739	349	87
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-996	-2100	-120	-175	-2567	-2528	2174	-2558	-587	-2583	-1806	1422	-1966	-461	-1038	-625	-1038	-2095	-2657	-1948	88
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(T)	-1213	-1674	-2755	-2906	-3163	-4922	-2659	-2698	-2789	-3105	-2612	-2311	-2600	-2706	-2753	-1463	-3619	-2197	-3286	-3156	89
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(I)	-286	-1279	-2907	-2663	-1446	-2549	-2189	-3280	-2407	-726	-534	-2386	1172	-2293	-2437	-1695	-1392	283	-2302	-1913	90
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(T)	-493	-1105	-289	-2267	-3101	1680	-2196	-2791	-2334	-3081	-2269	-1649	-2056	-2089	-2410	-719	-3135	-1948	-3282	-3046	91
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(V)	-1750	-1296	-4319	-3957	-1765	-4038	-3733	2364	-3826	-619	-543	-3716	-3869	-3685	-3932	-3354	-1743	-3012	-2285	-2817	92
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(E)	923	-962	-2348	-2422	-3132	-2071	-2249	-2850	-2440	-3140	-2285	-1624	-1954	-2156	-2477	3171	-758	-1896	-3362	-3103	93
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(D)	-2784	-3432	-4419	-1200	-4140	-2466	-2197	-4505	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2009	-3232	-2593	-2938	-4046	-3710	-3552	94
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-2694	-2650	-3304	-3623	-4328	-3747	-3452	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2961	-4004	-3669	-4222	95
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(J)	-1880	-1493	-4193	-3724	-953	-3637	-2980	-3251	-3420	257	2372	-3495	-3608	-3095	-3310	-3067	-1840	617	-2373	-2155	96
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(S)	2150	-939	-2407	-2415	-3075	-1197	-2205	-2781	-2364	-3065	-2205	-1613	-1936	-2105	-2493	2652	-729	-1850	-3306	-3049	97
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

(M)	-979	-1455	-1242	-1122	-1434	-1680	-1131	-1171	-974	-1265	-4091	2176	-2226	-1017	-1187	-1468	-1086	-1063	-1929	-1345	98
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3452	-4761	-3353	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	99
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(J)	-959	-1891	-1249	-949	-2563	-1747	-929	-2093	1282	-2283	-1554	-995	-2115	-600	-354	-1037	-3152	-1726	-2494	-2096	100
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(E)	-572	-1860	-209	-2213	-2107	-1461	-191	-1808	199	-116	-963	-127	318	1199	269	-475	-517	-1446	-2078	-1441	101
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(G)	-2694	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3452	-4761	-3353	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	102
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(M)	-2406	-2296	-3638	-3594	-1525	-3105	-2824	-1047	-3121	-596	-5043	-5295	-3426	-3046	-2996	-2611	-2552	-1398	-2513	-2207	103
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(R)	-2097	-2788	-2683	-1415	-3622	-2625	-555	-2964	2585	-2827	-1957	-1318	-2577	-137	-3018	-1979	-1791	-2732	-2469	-2363	104
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(Y)	-3615	-2705	-4169	-4413	-2626	-4044	-396	-2535	-3993	-939	-1935	-2747	-3930	-2852	-3446	-3296	-3494	-2886	347	-4252	105
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2686	-3497	-2730	-1973	-2360	-2483	-2703	-3465	-1316	-2413	-3310	-3025	106
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(L)	-2871	-2457	-4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-3734	-3130	-31	-3935	-3797	-3286	-3484	-3713	-2869	-1136	-2394	-2220	107
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(V)	-1381	-1055	-3714	-3252	-1453	-3300	-2646	1872	-3023	-615	-373	-2949	-3287	-2816	-3039	-2505	1346	-2750	-2489	-2087	108
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2686	-3497	-2730	-1973	-2360	-2483	-2703	-3465	-1316	-2413	-3310	-3025	109
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(R)	-2957	-3022	-3319	-2735	-3756	-2598	-1989	-3912	-848	-3631	-3157	-2911	-3260	-1724	-4256	-3026	-2913	-3653	-3096	-3185	110
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-1719	-3572	2895	-2779	-3767	-1632	-999	-3700	-1241	-3578	-2920	-234	-2167	-696	-2090	-1390	-1789	-3182	-3742	-2756	111
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1746	-1296	4308	-3946	-1757	-4020	-3712	2190	-3911	-614	-535	-3702	-3858	-3667	-3884	-3336	-1740	-3398	-3250	-2803	112
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(I)	-2091	-1746	-3971	-3340	-1676	-3532	-3289	-3684	-3581	-659	-693	-3562	-3674	-3445	-3521	-3194	-2146	449	-2677	-2493	113
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-3438	-1472	-2845	-3040	-3267	-1726	-2735	-2840	-3028	-3251	-2662	-2236	-2447	-2798	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	114
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-2784	-3432	-4016	-1200	-4140	-2466	-2197	-4505	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2039	-3232	-2593	-2938	-4046	-3710	-3552	115
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-352	2942	-2955	-2957	-2676	-1254	-2362	-2573	-2662	-2927	-2128	-1827	-2001	-2405	-2607	3103	-778	-1757	-3171	-2911	116
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(I)	-2091	-1746	-3971	-3340	-1676	-3532	-3289	-3684	-3581	-659	-693	-3562	-3674	-3445	-3521	-3194	-2146	449	-2677	-2493	117
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(E)	-2641	-3308	-695	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-1228	-4016	-3555	-1531	-2958	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	118
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	1556	-636	-2493	-2457	-2805	-1256	-2159	-2210	-2319	-2631	-1932	-1656	-1974	-2039	-2352	-599	-3235	-1547	-3111	-2947	119
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(C)	1784	2119	-2013	-1532	-1093	-1580	-1089	-436	-1322	-937	-273	1093	-932	-1127	-1472	-749	-515	1585	-1536	-1163	120
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(M)	1831	2013	-2595	-2058	-605	-1975	-1126	244	-1727	-359	-2501	-1655	-2145	-1435	-1693	-1106	-557	1087	-1153	-804	121
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(Q)	-967	-2211	43	-62	-2833	2229	-691	-2616	-407	-2624	-1797	1797	-1917	2230	858	-880	-1045	-2139	-2772	-2059	122
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	2313	-1042	-2391	-2526	-3250	-2601	-2372	-2972	-2337	-3257	-2407	-1721	-2032	-2310	-2646	-662	-859	-2003	-3434	-3247	123
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(Q)	-914	-2350	48	1661	-2621	-1571	2504	-2400	68	-2331	-1486	-201	-1796	2646	351	-754	-865	-1984	-2483	-1787	124
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(W)	-517	-1294	-733	-183	-1062	-1605	-234	-1037	19	-1207	-458	1435	-1690	33	756	411	-454	-819	-3340	1266	125
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	410	-469	-2417	-1828	-3411	-2041	-897	195	-1513	-158	3130	-1534	-2102	-1230	-1484	-1117	-507	954	-894	2253	126
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(D)	-2784	-3432	4016	-1207	-4140	-2466	-2197	-4505	-2521	-4365	-3956	-1551	-3014	-2038	-3232	-2693	-2938	-4046	-3710	-3552	127
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	2142	-830	-2334	-2298	-3100	-2237	-2139	-2842	-2302	-3074	-2187	-1557	-1909	-2010	-2397	1138	-701	-1871	-3309	-3053	128
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1514	-144	-3950	-3459	1821	-3437	-2577	2274	-3209	-209	-87	-3112	-3362	-2694	-3118	-2680	-1476	-2426	-2194	-1766	129
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(V)	-1743	-1294	-4292	-3673	-1511	-3983	-3433	2287	-3712	568	-319	-3626	-3774	-3456	-3718	-3260	-1717	-2790	-2931	-2577	130
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	2911	-854	-2808	-2665	-2115	-1577	-2169	-575	-2445	-1648	-1202	-1606	-2208	-2218	-2451	-901	-876	-1294	-2727	-2394	131
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1764	-1323	-4298	-3956	-1668	-3684	-3655	3337	-3783	508	-462	-3699	-3838	-3608	-3835	-3311	-1759	1847	-3164	-2747	132
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-1157	-1705	-2169	-2375	-3654	-3021	-2534	-3611	-2730	-5741	-2984	-2024	2418	-2475	-2826	-1361	-1555	-2705	-3513	-3509	133
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

9(C)	-2594	-2690	-3004	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	134
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(C)	-2476	-2655	-4102	-4358	-3712	-2763	-3545	-3518	-4167	-3859	-3559	-3631	-3365	-4030	-3832	-2793	-2860	-3159	-3464	-3718	135
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(D)	-2784	-3432	-4013	-1200	-4140	-2466	-297	-4305	-262	-4365	-3958	-1551	-3014	-2039	-3232	-2593	-2938	-4048	-3710	-3552	136
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(K)	-2623	-2961	-2461	-2046	-3743	-2791	-1570	-3603	-3784	-3337	-2639	-2048	-3039	-1260	-465	-2604	-2536	-3331	-3001	-2988	137
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(N)	-2171	-2655	-1459	-1748	-3334	-2364	-2267	-3943	-2368	-3938	-3497	-4205	-2932	-2205	-2678	-2224	-2439	-3392	-3253	-2609	138
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(M)	-2405	-2296	-3633	-3594	-1525	-3105	-2824	-1047	-3121	-598	5043	-3293	-5425	-3046	-2996	-2911	-2552	-1398	-2513	-2207	139
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(P)	-2931	-2878	-3423	-3706	-4181	-2925	-3468	-4621	-3659	-4490	-4165	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	140
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	-2594	-2690	-3004	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	141
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	-2180	-935	-2285	-2196	-3057	-1098	-2059	-2796	-2174	-3021	-2134	-1516	-1899	-1906	-2302	2146	-689	-1849	-3256	-2933	142
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(M)	-1799	-1433	-4142	-3579	-699	-3668	-2608	1558	-3293	1235	3799	-3296	-3401	-2717	-3088	-2643	-1726	1196	-2002	-1868	143
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(I)	-2091	-1746	-3971	-3840	-1676	-3532	-3289	-3694	-3561	-659	-693	-3562	-3674	-3445	-3521	-3194	-2146	449	-2877	-2493	144
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	-3100	-1036	-2445	-2572	-3222	1051	-2389	-2930	-2650	-3226	-2391	-1739	-2034	-2327	-2648	-664	-857	-1981	-3412	-3226	145
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(M)	-2325	-1891	-4598	-4012	-498	-4222	-3613	1242	-3722	1654	3929	-3855	-3711	-2910	-3414	-3439	-2215	-295	-2076	-2086	146
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(A)	-3103	-1036	-2445	-2572	-3222	1051	-2100	-2930	-2353	-2226	-2381	-1739	-2054	-2327	-2648	-664	-857	-981	-3412	-3226	147
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(R)	-1598	-2442	-1599	-953	-3069	-2171	-708	-2795	373	-2625	-1916	1858	-2357	-324	-294	-1520	-1505	-2453	-2523	-2186	148
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	-1448	-1256	-3396	-2619	-474	-3024	-1923	175	-2473	2225	2756	-2574	-2822	-2052	-2375	-2153	952	-151	-1599	-1410	149
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(N)	-1662	-3306	2055	78	-3621	-1643	-1040	-3622	-1272	-3531	-2870	3472	-2162	-724	-2071	-1371	-1757	-3092	-3633	-2700	150
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(T)	-1066	-921	-2828	-2239	-1041	-2675	-1601	-2235	-1668	-455	-82	-2067	-2662	-1638	1701	-1795	-1024	1960	-1771	-1366	151
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	-2831	-2878	-3420	-3706	-4181	-2925	-3468	-4621	-3359	-4490	-4165	-3491	-4225	-3731	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	152
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(S)	1568	-940	-2267	-2152	-3082	1101	-2068	-2826	-2193	-3049	-2159	-1515	-1901	-1915	-2313	2603	-684	-1866	-3279	-3006	153
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1880	-1492	-4195	-3728	-963	-3841	-2591	-3272	-3425	246	2277	-3490	-3613	-3014	-3317	-3092	-1841	628	-2395	-2163	154
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(F)	-2204	-1797	-3724	-3473	-3206	-3383	-628	-1077	-3392	-746	3167	-2502	-3309	-2372	-2792	-2535	-2120	-1245	28	2460	155
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(V)	1265	-1028	-3200	-2994	-1833	-2150	-2489	417	-2771	-1122	-818	-2349	-2640	-2539	-2766	-1464	-1118	-3028	-2700	-2325	156
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(Y)	-3462	-2868	-3701	-3919	238	-3552	-1112	-3000	-3338	-2516	-2526	-3027	-3772	-3101	-3341	-3418	-3527	-3071	441	-771	157
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	168
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	169
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(T)	-359	-676	-2225	-2229	-2500	-1242	-2074	-2580	-2170	-2875	-2054	-1561	-1958	-1965	-2247	1110	-3375	-1780	-3152	-2850	160
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(I)	-2091	-1746	-3971	-3840	-1676	-3532	-3289	-3684	-3581	-659	-693	-3562	-3674	-3445	-3521	-3194	-2146	449	-2677	-2493	161
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
6(H)	861	-1924	-384	1010	-2280	-1477	1787	-1974	1768	-1918	-1022	-120	-1566	362	697	-417	-469	-1557	-2073	-1446	162
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(P)	-655	-1502	-711	-557	-2204	-1463	2143	-2122	-586	-2233	-1445	-638	-2941	-560	941	855	-805	-1657	-2369	-1763	163
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	164
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(H)	-744	-2193	-114	1118	-2513	-1512	2486	-2252	1178	-2183	-1308	2230	-1689	180	-233	-598	-687	-1623	-2335	-1670	165
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
10(W)	-2672	-2139	-3850	-3749	941	-3611	-469	-1691	-3306	1047	-1217	-2551	-3534	-2514	-2990	-2798	-2577	-1799	-4295	3486	166
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
11(K)	386	-1981	779	279	-2295	-1403	-114	-2043	-2069	-1991	-1082	941	-1536	1253	211	-384	-457	-1602	-2161	-1476	167
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	168
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-1144	-2355	-912	2048	-2858	-1912	-326	-2459	-2267	-2295	-1482	-556	-1989	108	334	-1013	-1014	-2093	-2324	-1881	169
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

1(D)	-1091	-2610	-2941	174	-2957	-1527	-595	-2750	1084	-2696	-1877	-176	-1865	-206	-1008	740	-1098	-2288	-2880	-2105	170
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(L)	-2367	-1822	-4674	-4155	-617	-4366	-3259	1899	-3865	-2650	558	-4023	-3847	-3096	-3588	-3647	-2296	-36	-2247	-2224	171
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(N)	-1021	-2427	1808	133	-2870	-1499	-635	-2647	-521	-2640	-1825	2171	-1874	-255	-1124	-660	2122	-2184	-2853	-2090	172
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(I)	-1830	-1390	-4327	-3873	-1210	-3994	-3274	-2967	-3678	1259	30	-3633	-3730	-3283	-3604	-3249	-1791	1570	-2661	-247	173
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(V)	-1771	-1603	-3750	-3889	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1078	-3248	-3399	-3383	-3437	-2628	-1917	-3596	-3074	-2677	174
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2886	-3497	-2790	-1973	-2360	-2485	-2703	3465	-1316	-2413	-3310	-3025	175
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	2440	-824	-2371	-2082	-1993	-1344	-1704	-1264	-1899	-1832	-1137	-1517	-1946	-1674	-2009	1075	-641	1474	-2390	-2055	176
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(F)	-3442	-2776	-4026	-4232	-4354	-3545	-1431	-2315	-4008	-1801	-1900	-3298	-3780	-3350	-2645	-3490	-3420	-2566	-739	349	177
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(E)	-2641	-3308	-893	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-2126	-4016	-3555	-1531	-2959	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	178
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	2966	-1031	-2429	-2551	-3222	1544	-2368	-2934	-2633	-3225	-2377	-1727	-2026	-2308	-2637	-666	-850	-1980	-3412	-3224	179
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(V)	-1769	-1342	4255	-3763	-1216	-3901	-3167	1633	-3589	1498	-51	-3537	-3667	-3214	-3513	-3143	-1731	-2692	-2609	-2345	180
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3778	-2639	-2981	-4084	-3668	-4222	181
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(Q)	-729	-2116	-413	1096	-2484	-1597	1599	-2186	1695	-2054	-1219	-223	-1688	-2416	93	-599	-649	-1770	-2213	-1615	182
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(W)	-1652	-1707	-2340	-1879	1996	-2733	2013	-1398	1758	-1385	-938	-1641	-2751	-1364	-1762	-1780	-1577	-1325	-3577	2136	183
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(T)	-421	-753	-1251	-704	-846	-1670	-535	894	-548	-690	-1	1376	-1791	-421	-846	373	-467	859	-1236	-812	184
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(H)	1498	-1593	-504	15	-1895	-1484	2279	-1559	1119	-1640	-810	-242	-1611	194	-171	-462	815	-1231	-1914	-1340	185
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-1615	-2130	-1238	-1480	-2658	-3285	2212	-3276	-1691	-2291	-2634	-1524	-2562	-1662	-1925	-1600	-1764	-2713	-2804	-2234	186
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(K)	-528	-2010	1348	1082	-2329	-1408	-118	-2080	-1475	-2018	-1108	1161	-1543	331	1052	-294	-471	-1632	-2181	-1494	187
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(M)	-1894	-1521	-4173	-3679	-640	-3793	-2865	2827	-3360	375	-3445	-3437	-3555	-2902	-3223	-3028	-1846	470	-2249	-2059	188
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	-670	-1758	1731	-141	-2591	-1399	-891	-2319	-499	-2384	-1543	-387	-1786	-316	-1016	1576	-2044	-1811	-2624	-1981	189
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(E)	345	-2074	925	-1984	-2378	-1408	-177	-2135	922	-2084	-1183	-36	641	264	-356	-444	-538	-1690	-2261	-1556	190
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	-1493	-2900	93	-3174	-2903	-1743	1987	-3042	-346	-2957	-2238	-411	-2146	-506	-1121	-1272	-1503	-2629	-2906	-2134	191
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-1293	-2959	-2673	2121	-3219	-1546	-713	-3043	-707	-2974	-2191	-156	-1967	-342	-1394	-1043	701	-2567	-3172	-2311	192
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(F)	-1137	-905	-3250	-2707	-2565	-2647	-1016	-34	-2336	1239	267	-2150	-2626	-1661	-2132	-1752	-1089	1461	-599	1644	193
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

9(K)	-478	-1713	-409	1031	-1925	-1467	1755	-1350	-1844	-349	-827	-140	-1556	318	-78	-403	-411	-1301	-1900	843	194
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	433	-2144	52	1047	-2717	-2303	-615	-2467	-442	-2482	-1655	1123	-1828	-233	995	-763	-923	-2000	-2710	-2005	195
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(V)	-1752	-1320	-4254	-3905	-1311	-3916	-3232	1701	-3614	1188	-140	-3551	-3693	-3280	-3588	-3168	-1718	-2833	-2703	-2409	196
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(E)	-1198	-1750	-734	-2668	-1820	-2038	-1068	1892	-867	-1273	-897	-922	-2295	-797	-1238	-1340	-1197	-426	-2325	-1789	197
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(C)	-1182	3528	-1398	-620	-2541	-2038	-358	-2093	1181	-2037	-1272	-747	-2070	553	2213	-1723	-1038	-1817	-2142	-1774	198
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(N)	-1478	-2527	-261	-403	-2011	-1637	2032	-2925	-735	-2845	-2195	3638	-2259	-721	-1085	-1352	-1546	-2522	-2307	-1431	199
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	3438	-1472	-2845	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3251	-2652	-2236	-2447	-2796	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	200
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(C)	-1220	4911	-3609	-3314	-1440	-2525	-2482	1565	-2922	-706	-544	-2678	-2896	-2710	-2836	-1869	-1375	379	-2371	-1957	201
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(P)	-2931	-2878	-3420	-3706	-4181	-2925	-3468	-4621	-3659	-4490	-4155	-3491	-4225	-3781	-5695	-3162	-3279	-4087	-3594	-4064	202
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	-477	-1115	-1993	-2169	-3315	-3154	-2272	-3172	-2506	-3387	-2522	-1599	-2042	-2177	-2583	1217	-905	-2130	-3477	-3225	203
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	1653	-1347	-705	-249	-1968	-1385	-477	-1629	-159	-1759	-938	-434	1265	1494	-586	-450	1019	-1243	-2070	-1522	204
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	205
	149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(S)	1870	-938	-2270	-2183	-3069	1488	-2056	-2810	-2168	-3032	-2144	-1511	-1959	-1901	-2300	2236	-690	-1857	-2265	-2990	206
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(C)	-2476	-2476	-4102	-4358	-3712	-2763	-3545	-3518	-4167	-3659	-3599	-3631	-3369	-4030	-2832	-2793	-2860	-3156	-3464	-3718	207
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3482	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	208
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3482	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	209
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(M)	-2406	-2296	-3638	-3594	-1526	-3105	-2824	-1047	-3121	-598	-6043	-3293	-3426	-3046	-2996	-2511	-2552	-1396	-2513	-2207	210
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(Y)	-3590	-2700	-4146	-4379	2092	-4028	-404	-2517	-3963	-1926	-1973	-2744	-3921	-2845	-3431	-3284	-3474	-2669	336	-4423	211
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
6(T)	-1213	-1674	-2755	-2908	-3163	-1922	-2659	-2698	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2708	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3156	212
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(A)	-2438	-1472	-2845	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3228	-3257	-2662	-2236	-2447	-2798	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	213
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(N)	-2171	-2655	-1453	-1748	-3334	-2364	-2267	-3943	-2353	-3936	-3437	-4206	-2932	-2205	-2608	-2224	-2439	-3392	-3253	-2909	214
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(T)	-1213	-1674	-2755	-2908	-3163	-1922	-2659	-2698	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2708	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3156	215
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	-2355	-1988	-4343	-3834	-504	-4051	-2868	105	-3385	1451	-4460	-3680	-3671	-2806	-3171	-3227	-2274	-474	-2039	-1925	216
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(S)	2150	-939	-2407	-2415	-3075	-1197	-2205	-2781	-2384	-3055	-2235	-1613	-1936	-2105	-2436	-2652	-729	-1850	-3306	-3049	217
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(S)	-344	-679	-2193	-2162	-2959	-1227	-2042	-2651	-2116	-2934	-2100	-1526	-1941	-1909	-2222	2940	1775	-1804	-3187	-2882	218
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	3048	-632	-2480	-2533	-3075	-1200	-2274	-2765	-2501	-3071	-2221	-1658	-1948	-2205	-2512	1225	-739	-1842	-3322	-3078	219
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(I)	-1924	-1546	-4967	-3658	2312	-3663	-2081	3030	-3367	150	99	-3197	-5492	-2821	-3179	-2894	-1877	293	-1445	-652	220
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	-2841	-3308	-893	-3732	-3996	-2458	-2043	-4105	-2128	-4016	-3553	-1531	-2965	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	221
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	2389	-814	-2806	-2162	-1896	-1545	-1699	-499	-1942	-1398	-813	-1640	-2076	-1723	-2027	-806	1148	1659	-2200	-1856	222
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(M)	-2575	-2118	-4725	-4165	-461	-4430	-3165	99	-3811	2513	3454	-4075	-3838	-2978	-3488	-3704	-2457	591	-2111	-2145	223
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2694	-2890	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3362	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	224
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	-2313	-1968	-4258	-3765	-518	-3966	-2806	98	-3289	1292	4523	-3598	-3636	-2765	-3097	-3249	-2243	457	-2026	-1874	225
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3254	-2686	-3497	-2780	-1973	-2360	-2483	-2703	3465	-1316	-2413	-3310	-3025	226
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(L)	-2631	-2158	-4786	-4228	-462	-508	-3231	96	-3878	2828	2482	-4157	-3880	-3016	-3541	-3793	-2509	608	-2134	-2182	227
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(P)	-1601	-1778	-2473	-2371	-1710	-2311	-2045	-1321	-2060	827	-1068	-2173	-3594	-2082	-2130	-1799	-1699	-1373	-2373	-1942	228
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(Y)	-1068	-1670	-865	-836	-631	1198	-767	-1828	-1059	-1914	-1304	632	-2203	-906	-1387	-1136	-1163	-1566	-1183	-3670	229
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

1(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2686	-3497	-2780	-1973	-2360	-2433	-2703	3465	-1316	-2413	-3310	-3025	230
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(S)	1172	-954	-2367	-2422	-3120	-1204	-2237	-2835	-2426	-3122	-2265	-1621	-1946	-2145	-2467	3107	-749	-1894	-3349	-3092	231
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-342	-975	-2176	-2124	-2912	-1229	-2003	-2594	-2067	-2878	-2048	-1510	-1936	-1865	-2184	2553	2492	-1773	-3143	-2833	232
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(M)	-720	-1440	-710	-343	-1228	-1693	2436	-1209	-132	-1364	3039	1934	-1852	-183	458	-776	-680	-1304	-1540	-890	233
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	2240	-1100	-2241	-2293	-3037	-1346	-2188	-2683	-2317	-2696	-2210	-1653	-3041	-2093	-2391	-722	-886	-1893	-3243	-2986	234
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	3958	-1235	-1299	-1377	-2668	-1345	-1673	-2580	-1661	-2843	-2054	1555	-1995	-1468	-1921	-715	-868	-1671	-3064	-2630	235
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-509	-1046	-894	-1564	-1116	-1669	-441	-485	-263	250	-206	-577	669	-200	-656	-670	-459	1290	-1467	-995	236
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(D)	-1203	-2412	-2395	-117	-3266	-1536	-1057	-3176	-165	-3196	-2436	-429	-2068	-736	-1824	2377	-1366	-2578	-3334	-2552	237
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(Q)	954	-1983	-100	971	-2537	177	-267	-2087	81	-2060	-1159	-125	-1637	-2600	418	-514	-597	-1649	-2238	-1597	238
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-2641	-3308	-896	-3752	-3956	-2458	-2043	4105	2128	-4016	-3555	-1531	-2958	-1642	-2550	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	239
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(K)	-2620	-2961	-2461	-2046	-3743	-2791	-1570	-3600	-3784	-3387	-2836	-2048	-3039	-1290	465	-2604	-2536	-3331	-3001	-2988	240
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(R)	377	-1802	-415	968	-2095	-1474	-95	-1786	1452	-1785	-911	-135	-1560	343	-1559	-409	-431	376	-1986	-1375	241
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(D)	1083	-1555	2662	-244	-1941	-1573	-679	812	-527	-1651	-990	-499	-1869	-358	-1003	-771	-766	-803	-2208	-1633	242
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(E)	-1225	-2868	1891	1949	-3149	-1532	-671	-2975	-630	-2902	-2101	-150	-1935	293	-1296	1864	-1241	-2496	-3093	-2248	243
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(C)	1375	3262	-2620	-2108	-827	-1866	-1267	1831	-1811	-599	-10	-1674	-2137	-1531	-1786	-1034	790	249	-1361	-1010	244
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(E)	635	-1796	1055	1761	-2018	-1464	-263	1191	28	-1767	-946	-148	-1637	135	-48	-520	-553	-1300	-2077	-1441	245
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	593	-2044	-252	2548	-2437	-1542	-329	-2133	151	-2120	-1274	-244	-1738	89	946	-646	-717	-1734	-2305	-1686	246
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(S)	1884	-835	-1462	-1576	-1634	-1436	-1320	1341	-1409	-1453	-781	-1293	-1922	-1241	-1606	1973	-597	-669	-2036	-1656	247
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	2267	-1043	-2338	-2526	-3253	2642	-2373	-2975	2639	-3260	-2410	-1122	-2033	-2311	-2648	-663	-860	-2005	-3436	-3260	248
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(R)	-876	-2087	-829	1450	-2474	-1766	-229	-2106	1289	-44	-1196	-424	-1829	205	2223	-775	-788	-1753	-2143	-1647	249
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(V)	2339	-967	-2970	-2766	-1878	-1647	-2252	32	-2541	-1299	-918	-2097	-2399	-2316	-2545	-1157	-971	2949	-2605	-2251	250
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1827	-1398	4307	-3631	-1099	-3639	-3142	2286	-3619	1835	69	-3579	-3671	-3777	-3511	-3178	-1781	1918	-2524	-2310	251
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1178	-1448	-1943	-1452	-1776	-2261	-1140	-227	1868	-1260	-816	-1444	-2448	-902	-540	-1456	-1176	2697	-2161	-1764	252
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(E)	-508	-1976	840	1547	-2280	-1293	-117	-2029	1400	-1984	-1077	1158	-1531	330	253	-378	-454	262	-2163	-1471	253
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

9(M)	1703	-691	-2901	-2342	-528	-2567	-1553	166	-203	1544	2668	-2104	-2591	-1713	-2010	-1685	-1052	-12	-1442	-1177	254
	149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
9(N)	-1947	-1516	-4385	-3885	-916	-4013	-3113	2163	-3656	2186	257	-3658	-3867	-3105	-3494	-3250	-1889	1383	-2397	-2258	255
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
9(E)	-1322	-2647	-272	2491	-3071	-181	-576	-2759	2308	-2833	-1854	-464	-2066	-175	-177	-1144	-1286	-2368	-2692	-2140	256
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
1(K)	-1396	-2052	-1711	-1014	-2215	-2218	-641	-1709	302	-1852	2578	-1075	-2303	-282	287	-1423	-1283	-1803	-2159	-1803	257
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
2(D)	-1285	-2888	2677	175	-320	1189	-737	-3047	-715	-2977	-2198	-190	-1979	2106	-1379	-1050	-1315	-2564	-3161	-2320	258
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
3(I)	-2073	-1632	-434	-3975	-911	-4130	-3238	3164	-3708	145	244	-3779	-3765	-3187	-3557	-3413	-2021	546	-2449	-2273	259
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
4(K)	-1570	-2144	-1887	-1191	-2058	-2363	-753	-1803	3034	938	-1112	-1231	-2436	-405	215	-1616	-1443	-1580	-2165	-1804	260
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
5(P)	-2931	-2878	-3420	-3706	-4181	-2925	-3463	-4621	-3859	-4430	-4165	-3491	4225	-3781	-3635	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	261
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
6(R)	-928	-1705	-1507	-1055	-2761	-1730	-895	-2450	44	-2439	-1723	-1042	-2102	543	2814	2259	-1053	-1998	-2546	-2158	262
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
7(D)	-1280	-2865	3154	175	-3194	-1547	-743	-3034	-728	-2971	-2194	-190	-1979	1342	-1397	553	-1316	-2552	-3161	-2317	263
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
8(I)	-1997	-1562	-4355	-3927	-1042	-4066	-3261	3343	-3654	937	97	-3718	-3783	-3239	-3555	-3384	-1959	702	-2549	-2295	264
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														
9(M)	-2252	-1821	-4572	-3991	-550	-4164	-2993	2068	-3709	1993	3197	-3808	-3665	-2916	-3406	-3578	-2149	-172	-2084	-2081	265
	-149	-500	233	43	-381	399	105	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-70	-1373														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(T)	-1213	-1674	-2755	-2908	-3163	-1922	-2659	-2698	-2788	-3103	-2612	-2311	-2800	-2706	-2753	-1463	-3319	-2197	-3286	-3156	266
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
4(R)	-2131	-2786	-2704	-1460	-3618	-2638	-587	-2976	1735	-2645	-1985	-3553	-2805	-175	-3492	-2020	-1828	-2748	-2484	-2384	267
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
2(K)	-1349	-2635	-381	2063	-3083	-1857	-565	-2750	-2690	-2612	-1837	-514	-2090	-161	-61	-1178	-1271	-2369	-2655	-2138	268
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-2821	-632	-2451	-2472	-3065	-1198	-2233	-2763	-2434	-3056	-2201	-1633	-1940	-2147	-2438	1631	-730	-1840	-3305	-3055	269
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
4(F)	-2053	-1686	-4037	-3677	-3437	-3644	-1706	2063	-3359	135	67	-3096	-3486	-2738	-3127	-2876	-2012	-83	-1038	-158	270
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-2641	-3308	-865	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-2128	-4018	-3555	-1531	-2969	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	271
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(N)	-1662	-3306	2055	78	-3621	-1643	-1040	-3622	-1272	-3531	-2870	-3477	-2182	-724	-2071	-1371	-1757	-3082	-3633	-2700	272
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
7(A)	-2438	-1472	-2846	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2662	-2236	-2447	-2796	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	273
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
8(I)	-1760	-1307	-4325	-3962	-1735	-4042	-3728	-3135	-3828	-579	-515	-3722	-3869	-3673	-3893	-3359	-1752	-2276	-3240	-2806	274
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	1428	-904	-2334	-2158	-2747	-1206	-1940	-2392	-2037	-2678	-1848	-1504	-1896	-1809	-2163	902	-3001	-1635	-2999	-2705	275
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1745	-1300	-4285	-3858	-1446	-3667	-3370	2358	-3688	852	-261	-3606	-3749	-3403	-3673	-3232	-1717	-2643	-2856	-2524	276
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
1(V)	-1404	-1072	-3765	-3305	-1464	-3356	-2696	2276	-3300	-516	-379	-3001	-3325	-2870	-3091	-2563	1344	-2521	-2516	-2113	277
	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(M)	866	-1113	-2656	-2412	-1322	-1920	-1883	-487	-2361	-507	4451	-1950	-2367	-1928	-2078	-1220	-1053	-498	-2134	-803	278
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(A)	2601	-657	-2893	-2711	-1943	-1740	-2211	-165	-2487	-1406	-1001	-2038	-2320	-2250	-2434	-1053	929	-1990	-2626	2279	279
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
4(L)	-1171	-983	-3268	-2733	-796	-2795	-1883	590	-2418	2301	198	-2418	-2816	-2108	-2382	-1944	965	1777	-1724	-1426	280
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
5(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2881	-4004	-3688	-4222	281
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2881	-4004	-3688	-4222	282
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
7(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2888	-3497	-2780	-1973	-2360	-2483	-2703	-3465	-1316	-2413	-3310	-3025	283
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(T)	-1213	-1674	-2755	-2905	-3163	-1922	-2659	-2698	2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2708	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3166	284
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(N)	2171	-2655	-1458	-1743	-3334	-2364	-2267	-3543	-2363	-3938	-3437	-4205	-2932	-2205	-2808	-2224	-2439	-3392	-3253	-2909	285
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(A)	3134	-834	-2491	-2567	-3083	-1203	-2303	-2766	-2540	-3082	-2237	-1672	-1954	-2240	-2537	874	-747	-1844	-3333	-3053	286
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
1(V)	-984	-1045	-3169	-2909	-1709	-2304	-2404	531	2643	-988	-697	-2378	-2722	-2490	-2661	-1601	1504	-3014	-2588	-2201	287
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
2(L)	-2631	-2159	-4786	-4223	-462	-4506	-3231	98	-3878	-2828	2482	-4157	-3880	-3016	-3541	-3793	-2509	-688	-2134	-2182	288
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(H)	-3206	-3079	-2723	-2897	-2110	-3046	5295	-4135	-2617	-3813	-3561	-2886	-3462	-2832	-2620	-3291	-3356	-3895	-2397	-1681	289
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(L)	-1623	-1338	-3723	-3164	-251	-3253	-1923	1373	-2808	-237	514	-2785	-3068	-2281	-2613	-2389	-1543	-161	-1311	1732	290
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
5(L)	-2333	-1873	-4643	-4127	-650	-4326	-3241	2176	-3843	-2519	523	-3692	-3833	-3135	-3579	-3604	-2247	56	-2268	2230	291
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-3436	-1472	-2846	-3040	-3267	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2652	-2236	-2447	-2796	-2944	-1216	-1367	-2183	-3405	-3320	292
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
7(M)	-1886	-1507	-4173	-3683	-677	-3605	-2901	3008	-3384	335	-3109	-3451	-3570	-2934	-3251	-3044	-1840	524	-2288	-2089	293
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	-3436	-1472	-2846	-3040	-3267	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2652	-2236	-2447	-2796	-2944	-1216	-1367	-2183	-3405	-3320	294
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(H)	-1490	-2484	-362	-476	-1616	-1680	-4323	-2654	-684	-2770	-2133	2185	-2265	-726	-1000	-1377	-1550	-2475	-2146	-1255	295
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-2439	-91	-2323	-2121	-2611	-1197	-1534	-2480	-20	-2745	-1898	-1490	-1868	-1735	-2153	1698	1073	-1682	-3044	-2749	296
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
1(I)	2036	-985	-3389	-2919	-1320	-2693	-2277	2155	-2877	-587	-297	-2593	-2992	-2450	-2667	-2067	-1208	1681	-2229	-1845	297
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	-1243	-2769	311	1902	-3172	-980	-744	-2992	-697	-2936	-2152	1923	-1974	-377	-1331	-1030	-1284	-2506	-3125	-2308	298
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1738	-1298	-4281	-3921	-1737	-3979	-3665	1917	-3774	-601	-528	-3671	-3834	-3626	-3843	-3293	-1735	-3095	-3215	-2770	299
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
4(E)	-833	-2344	1092	-2432	-2643	-1464	-365	-2413	-146	-2369	-1505	-95	562	29	-717	-668	862	-1966	-2562	-1818	300
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(W)	-1380	-1116	-3614	-3026	1522	-2991	-1582	1956	-266	1775	556	-2562	-2865	-2117	-2424	-2098	-1302	-187	-2906	-629	301
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(T)	-350	-873	-2204	-2178	-2893	-1236	-2035	-2581	-2117	-2852	-2043	-1536	-1946	-1916	-2214	1618	-3168	-1758	-3137	-2831	302
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
7(L)	-1443	-1269	-3144	-2576	-528	-3014	-1815	1945	-2159	-2102	508	-2422	-2899	1193	-2133	-2129	-1369	-50	-1616	-1364	303
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
9(D)	-1826	-3682	-3559	1199	-3883	-1662	-1073	-3846	-1391	-3720	-3110	-272	-2222	-760	-2283	-1471	-1913	-3321	-3664	-2864	304
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
9(D)	-2704	-3432	-4019	-1200	-4140	-2466	-2197	-4595	-2621	-4395	-3958	-1551	-3014	-2036	-3232	-2583	-2938	-4046	-3710	-3552	305
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(F)	-3342	-2776	-4026	-4232	-4354	-3545	-1431	-2315	-4038	-1911	-1600	-3299	-3780	-3350	-3645	-2490	-3420	-2566	-739	349	306
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
1(Q)	-1048	-2608	205	2170	-2893	-1535	-503	-2690	-255	-2694	-1759	1814	-1849	-2272	-799	-843	-1028	-2228	-2770	-2013	307
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
2(R)	1083	-1687	891	135	-2058	-1406	-173	-1755	214	-1793	-924	-145	-1553	247	-1670	-383	1217	-1367	-2031	-1404	308
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(I)	-1915	-1536	-4077	-3687	2027	-3678	-2155	-3137	-3381	144	94	-3225	-3506	-2848	-3202	-2914	-1871	345	-1522	-791	309
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
4(R)	-688	-2015	-494	24	-2396	-1582	-184	-2087	444	-2320	-1151	1161	-1687	1832	-2131	628	-614	-1684	-2156	-1573	310
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(D)	387	-1967	-1602	1353	-2275	-1391	1561	-2026	282	-1976	-1067	25	-1525	342	1024	-369	443	-1584	-2152	-1462	311
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
3(R)	-1460	-2315	-1793	-887	-2832	-2237	-431	-2288	2193	-2199	-1473	-946	-2245	-70	-2706	-1394	-1275	591	-2248	-1961	312
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														
7(V)	-841	-1027	-3039	-2832	-1652	-2234	-2324	470	-2563	-1303	-685	-2196	-2663	-2396	-2587	-1527	1858	-2876	-2536	-2152	313
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1373														

Tabla 1

3(P)	-2931	-2878	-3423	-3705	-4181	-2925	-3468	-4621	-3859	-4490	-4155	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	314
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1090	-1215	-2097	-1824	-819	-2221	-2699	-287	-1392	-1027	-581	-1674	-2462	-1446	-1432	-1482	-1143	-2878	-1420	-707	315
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2439	-1972	-4702	-4761	-588	-4401	-3258	1522	-3931	-2757	581	-4031	-3862	-3093	-3591	-3689	-2344	-1301	-2230	-2217	316
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(C)	2157	4166	-3012	-2973	-2780	1022	-2307	-2396	-2724	-2744	-930	-1786	-1943	-2372	-2623	-540	-692	-1624	-3091	-2881	317
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-1732	-3453	-3498	96	-3733	-1645	-1065	-3747	-1366	-3841	-3008	690	-2201	-765	-2208	-1418	-1833	-3208	-2752	-2776	318
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-2477	-2623	-4713	-4122	1552	-4329	-2527	72	-3835	-2593	2472	-3948	-3754	-2614	-3468	-3550	-2350	-634	-1927	-1830	319
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-2620	-2951	-2461	-2046	-3743	-2791	-1570	-3603	-3784	-3387	-2839	-2048	-3039	-1261	-465	-2634	-2536	-3331	-5001	-2986	320
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	-2931	-2878	-3423	-3705	-4181	-2925	-3468	-4621	-3859	-4490	-4155	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	321
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2866	-3497	-2790	-1975	-2360	-2483	-2702	-3465	-1316	-2413	-3370	-3025	322
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-1747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	323
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(W)	2	-2257	-1073	-374	-2740	-1908	-278	-2339	-2328	-2192	-1373	-552	-1952	2273	1344	952	-933	-1990	-2234	-1799	324
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(Y)	-3482	-2856	-3701	-3919	230	-3552	-1112	-3000	-3639	-2518	-2526	-3027	-3772	-3101	-3347	-3416	-3527	-3071	-441	-4711	325
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(N)	-1559	-1267	-3829	-3382	-1100	-1357	-2655	805	-3067	-67	3046	-3065	-3226	-2779	-3011	-2591	-1556	2855	-2312	-1998	326
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	1225	-469	-2255	-1679	1656	-1926	-870	90	-1396	-210	2763	-1424	-2026	-1129	-1411	-1008	712	154	-951	-586	327
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	-738	-2094	-84	1704	-2416	-1495	-317	-2135	81	-2127	-1273	-163	-1704	1857	-405	-613	-1930	-1734	-2331	-1668	328
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-1748	-3458	-3540	93	-3744	-1650	-1081	-3767	-1381	-3682	-3036	1366	-2211	-772	-2238	-1428	-1850	-3226	-3763	-2789	329
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2451	-1883	-4707	-4185	-582	-4409	-3259	1510	-3884	-2778	592	-4063	-3865	-3091	-3590	-3698	-2355	-150	-2225	-2214	330
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(H)	-2923	-2572	-2859	-2925	826	-3449	4553	-2508	-2463	-2054	-1948	-2279	-3469	-2191	-2307	-2767	-2855	-2540	123	2920	331
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	373	-1957	-342	1025	-2297	-1472	-98	-2018	-2111	-1954	-1058	906	-570	352	685	-424	-473	-1582	-2105	-1469	332
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	1739	-1008	-3509	-3043	-1376	-3028	-2406	1765	-2807	-615	-334	-2718	-3093	-2585	-2823	-2226	-1263	-2376	-2322	-1931	333
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-5352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	334
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-5352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	335
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1758	-1302	-4331	-3970	-1758	-4054	-3748	-2976	-3840	-603	-533	-3731	-3877	-3693	-3914	-3372	-1750	2505	-3265	2824	336
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	-2931	-2676	-3420	-3706	-4181	-2925	-3468	-4621	-3859	-4490	-4165	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4054	337
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(C)	1795	-1440	-730	-492	-2453	682	-612	-2151	-508	-2256	-1426	-624	-1796	-2636	-901	-590	-669	-1636	-2510	-1971	338
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
3(V)	-1771	-1605	-5750	-3669	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1076	-3246	-3399	-3333	-3437	-2628	-1917	-3536	-3074	-2677	339
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
4(M)	-2355	-1986	-4543	-3834	-504	-4051	-2888	105	-3385	1451	4486	-3690	-3671	-2806	-3171	-3327	-2274	-474	-2039	-1925	340
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
5(K)	-2620	-2961	-2461	-2046	-3743	-2791	-1570	-3603	-3784	-3337	-2839	-2048	-3039	-1230	-465	-2604	-2536	-3331	-3001	-2968	341
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
6(Y)	-1187	-974	-5186	-2638	-117	-2732	-1255	1905	-2270	73	1977	-2217	-2639	-1892	-2144	-1841	-1124	71	-907	-3254	342
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
7(L)	-2871	-2457	-4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-5734	3130	-31	-3935	-3797	-3296	-3484	-3713	-2969	-1136	-2394	-2220	343
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
9(L)	-2871	-2457	-4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-5734	3130	-31	-3935	-3797	-3296	-3484	-3713	-2969	-1136	-2394	-2220	344
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
9(C)	864	-1785	-860	-366	2128	-763	-407	-1612	-2624	-1800	-1045	629	-1900	-28	62	-851	-805	1127	-2064	-1561	345
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
3(N)	602	-1686	-275	1008	-1926	-415	1529	-1618	244	-1673	-815	1897	-1530	296	-244	-371	-391	322	-1934	-1306	346
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
1(G)	-706	-2639	1362	-690	-3785	-3257	-1671	-3805	-1946	3792	-3137	-990	-2460	-1424	-2576	-1630	-1936	-3150	-3628	-3155	347
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
2(F)	942	-799	-2828	-2226	-797	-2476	-1269	1108	561	1793	516	-1952	-2453	-1557	-1815	-1558	-875	52	-1138	-794	348
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													
3(L)	-2451	-1983	-4707	-4185	-582	-4409	-3259	1510	-3884	2778	592	-4039	-3865	-3091	-3580	-3698	-2355	-150	-2226	-2214	349
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-694	-1115	-701	-1378	*													

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(H)	-3205	-3075	-2723	-2890	-2110	-3046	5295	-4135	-2617	-3813	-3531	-2886	-5462	-2633	-2620	-3291	-3356	-3695	-2397	-1681	350
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	351
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-2784	-3432	-4918	-1200	-4140	-2466	-297	-4505	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2009	-3232	-2593	-2938	-4046	-3710	-3552	352
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(C)	774	4452	-2162	-1668	-1962	-1476	-1302	-1474	-944	-1796	-1088	-1351	-1975	-1147	1694	-732	-719	-1116	-2225	-1881	353
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2387	-1922	-4674	-4155	-617	-4366	-3250	1899	-3865	-2650	558	-4023	-3847	-3096	-3596	-3647	-2296	-38	-2247	-2224	354
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	-1213	-1674	-2755	-2906	-3163	-1922	-2659	-2698	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2706	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3156	355
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(C)	-1488	2972	-4007	-3563	-1524	-3541	-2939	2612	-3350	-617	-413	-3224	-3470	-3129	-3335	-2770	-1475	2265	-2657	-2248	356
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(T)	-364	-979	-2232	-2250	-2904	-1245	-2060	-2559	-2191	-2981	-2075	-1571	-1964	-1991	-2290	905	-3428	-1762	-3159	-2658	357
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	358
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-1716	-2632	-2004	-1008	-3536	-2379	-44	-2764	-2775	-2484	-1756	-1035	-2357	2151	1811	-1592	-1477	-2481	-2391	-2172	359
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(T)	-1213	-1674	-2755	-2906	-3163	-1922	-2659	-2698	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2706	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3156	360
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1771	-1339	-4275	-3816	-1235	-3919	-3194	2139	-3517	1520	-66	-3558	-3681	-3244	-3547	-3164	-1733	-2390	-2634	-2368	361
	149	500	233	43	381	399	106	626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	369	294	249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

5(A)	3438	-1472	-2846	-3043	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2662	-2236	-2447	-2798	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	362
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
7(E)	-2641	-3309	-895	3722	-3666	-2458	-2043	-4105	-2128	-4016	-3555	-1531	-2859	-1842	-2580	-2479	-2750	-3722	-3583	-3385	363
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
5(N)	-823	-1917	-95	1188	-2187	-1547	-508	-1711	-285	-1955	-1191	2711	-1815	-144	-747	-757	-815	1140	-2297	-1666	364
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
3(L)	-2153	-1779	-403	-3864	-675	-3965	-3012	392	-358	2726	467	-3673	-3652	-2955	-3355	-3239	-2102	1231	-2207	-2099	365
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
7(E)	1136	-2034	-175	2027	-2436	-1510	-274	-2147	1528	-2118	-1254	-175	-1642	152	-251	-593	-670	-1736	-2246	-1680	366
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
1(H)	893	-1781	1357	214	-2092	-1387	1862	-1810	229	-1825	-942	-83	-1527	233	273	640	793	-1409	-2030	-1397	367
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
3(I)	608	-458	-2776	-2176	1666	-2202	-1113	1712	-1836	-222	338	-1782	-2245	-1512	-1731	-1292	867	1369	-1036	-684	368
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
3(P)	-922	-1912	1681	-141	-2123	-1604	-687	-1787	-550	187	-245	-427	2677	-383	-1049	-882	-947	-1524	-2338	-1711	369
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
4(D)	-1692	-3605	3364	1259	-3770	-1599	-957	-3700	-1216	-3594	-2909	1025	-2138	-626	-2083	-1346	-1761	-3174	-3785	-2736	370
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
5(Q)	-877	-1646	-633	499	-1610	-1781	-505	-1210	-63	1648	649	558	-1931	2241	-350	907	-814	-1097	-1882	-1385	371
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-864	-1115	-701	-1373														
3(P)	-648	-2019	1139	203	-2654	-1436	-285	-2089	29	-2086	-1217	-114	1965	1445	492	-529	1244	-1672	-2300	-1616	372
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-571	-7108	-1646	-864	-1115	-701	-1373														
7(R)	-422	-1003	-851	-304	1406	-1498	-183	-740	147	-894	-230	-443	775	21	2069	539	-381	-568	-1136	-521	373
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-23	-6560	-7602	-864	-1115	-341	-2249														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(D)	1472	-1688	1635	-70	-2358	-1385	-511	-2062	-246	-2128	-1275	-316	1353	-116	-746	-526	425	-1602	-2380	-1752	374
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-1042	-2230	2141	-100	-3222	-2291	-982	-3045	-1033	-3350	-2258	-395	-1985	-64	-1669	659	-1207	-2428	-3250	-2493	375
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(O)	-2562	-2904	-1888	-1971	-3251	-2661	-2079	-3690	-1565	-3489	-3081	-2107	-3091	-4371	-1665	-2585	-2674	-3411	-3077	-2821	376
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(D)	-275	-2958	-2862	1330	-3236	-1556	-670	-3029	1508	-2936	-2141	-156	-1955	-290	-213	-1025	-1281	-2554	-3111	-2272	377
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(V)	-1738	-1298	-4291	-3821	-1737	-3979	-3665	1917	-3774	-601	-628	-3671	-3834	-3628	-3843	-3293	-1735	-2265	-3215	-2770	378
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-2091	-1746	-3871	-3840	-1676	-3532	-3289	-3684	-3581	-659	-683	-3562	-3674	-3445	-3521	-3194	-2146	449	-2877	-2493	379
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(M)	-584	-1354	-847	-245	-1467	-1659	2505	-1087	222	-374	-2571	-449	-1729	1171	1074	-634	-507	-876	-1617	-1128	380
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(P)	-910	-2031	-73	1195	-2792	-1488	-794	-2539	-629	-2588	-1788	-401	-3008	-438	-1131	612	-1014	-2050	-2815	-2151	381
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(W)	-1588	-1300	-3783	-3197	-329	-3245	-1926	2071	-2827	1901	558	-2622	-3072	-2297	-2616	-2381	-1508	-111	-3483	-1042	382
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(E)	-1024	-2640	1844	-2310	-2908	-1498	-505	-2711	-344	-2636	-1791	-107	-1824	1521	-957	207	-1011	-2243	-2817	-2021	383
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(N)	-825	-2349	1089	227	-2651	-1487	-341	-2416	1494	-2346	-1475	2601	-1724	1005	522	-657	-787	-1966	-2511	-1791	384
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	1832	-1116	-2232	-2301	-3058	-1358	-2206	-2706	-2368	-3009	-2238	-1674	-3274	-2114	-2406	-735	-914	-1913	-3260	-3019	385
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(V)	-914	-773	-2113	-2129	-712	-2505	-1388	1452	1084	1324	204	-1926	-2507	-1580	-1808	-1591	-859	-1713	-1424	-1081	385
	149	500	233	43	381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(Y)	-1484	-2331	-1762	-667	-2436	-2254	-420	-2325	2137	-2195	-1475	-949	-2258	-39	1983	-1411	-1295	-2075	-2087	-2666	387
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	1256	-1690	-205	1353	-2196	-1401	-89	-1930	812	-1896	-998	45	547	1252	-182	-356	-414	-1507	-2083	-1416	388
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(Q)	-752	-2272	1593	1407	-2561	-1448	-308	-2329	-23	-2276	-1296	-71	-1677	1748	577	-590	1569	-1681	-2438	-1727	389
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2694	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3688	-4222	390
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(H)	-964	-2089	-203	-136	-2264	-1600	3833	-2320	-296	-2338	-1558	1362	1479	-276	699	-861	-952	-1624	-2364	-1652	391
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2451	-1983	-4707	-4166	-582	-4409	-3259	1510	3984	2778	592	-4089	-3865	-3091	-3590	-3698	-2355	-150	-2226	-2214	392
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(O)	1643	-1017	-1195	-721	-1189	-1714	-683	1336	-497	-937	-297	-823	-1893	2044	-794	-784	-569	-339	-1579	-1139	393
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1760	-1308	4323	-3961	-1730	-4034	-3721	-3156	-3925	-575	-512	-3720	-3867	-3669	-3893	-3256	-1753	2241	-3246	-2802	394
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2871	-2457	4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-3734	-3130	-31	-3935	-3797	-3236	-3484	-3713	-2869	-1136	-2394	-2220	395
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-1259	-2115	-1262	-676	-970	-2105	1794	-2040	-2549	-1955	-1262	-806	-2165	-167	114	-1192	-1140	-1801	-1301	2517	396
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2694	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3688	-4222	397
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8153	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(N)	-2171	-2858	-1458	-1748	-3334	-2564	-2267	-3943	-2385	-3936	-3437	4235	-2582	-2205	-2608	-2224	-2439	-3392	-3253	-2909	398
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2871	-2457	4231	-4103	-1033	-3803	-3165	-541	-3734	-3130	-31	-3935	-3797	-3285	-3484	-3713	-2869	-1136	-2394	-2220	399
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(A)	-3121	-934	-2489	-2561	-3081	-1203	-2295	-2786	-2533	-3080	-2234	-1689	-1953	-2234	-2533	936	-746	-1844	-3331	-3090	400
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	-622	-1773	-240	-1676	-2249	-1396	-289	-1968	50	-1989	-1115	-174	1198	131	-448	1226	677	-1538	-2214	-1555	401
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
6(E)	-1481	-3230	1425	-2636	-3481	751	-643	-3354	-854	-3256	-2520	-187	-2057	-492	-1711	-1193	-1527	-2852	-3445	-2523	402
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(G)	-2594	-2692	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4781	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2881	-4004	-3668	-4222	403
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(A)	-2847	-632	-2454	-2477	-3038	-1198	-2236	-2763	-2439	-3057	-2202	-1635	-1940	-2152	-2471	1777	-731	-1840	-3306	-3056	404
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(V)	-1771	-1603	-3750	-3689	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1078	-3246	-3399	-3383	-3437	-2628	-1917	-3636	-3074	-2877	405
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(A)	-3438	-1472	-2848	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2662	-2235	-2447	-2798	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	406
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(K)	-2620	-2661	-2461	-2046	-3743	-2791	-1570	-3603	-3784	-3397	-2839	-2346	-3036	-1260	-465	-2604	-2536	-3331	-3001	-2988	407
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(I)	-1761	-1312	4317	-3954	-1713	-4027	-3703	-3225	-3614	-556	-498	3712	-3859	-3653	-3877	-3344	-1754	2110	-3216	-2877	408
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-348	-881	-2202	-2194	-2988	-1227	-2773	-2686	-2157	-2970	-2136	-1541	-1946	-1946	-2253	3060	1398	-1824	-3217	-2316	409
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(G)	-2594	-2690	-3034	-3623	-4320	-3747	-3462	-4781	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2561	-4004	-3568	-2222	410
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(V)	-917	-808	-2556	-1976	-827	-2491	-1367	1339	1455	72	94	-1841	-2501	-1487	-1710	-1570	-863	-2038	-1514	1151	411
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(K)	-1386	-2843	-447	1824	-3108	-1893	-570	-2762	-2883	-2616	-1848	-552	-2117	-166	-3	-1217	-1300	-2388	-2647	-2154	412
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(N)	-537	-1563	-443	-36	-1889	1143	-307	-1529	932	-1655	-844	1784	-1658	73	356	-518	-516	924	-1962	-1352	413
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(P)	-894	-281	-369	1705	-2576	-1650	-357	-2268	243	-2210	-1375	-330	-2093	63	1619	-774	-835	-1876	-2347	-1789	414
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-419	-634	-1375	-807	1053	-1737	-499	-198	-623	-526	178	600	-1807	-475	478	313	-360	-1389	-1076	1303	415
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1282	-1082	-3022	-2555	2426	-2693	1767	-2555	-2191	443	-88	-2038	-2682	-1794	-2075	-1793	-1220	-317	-361	552	416
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(T)	-499	-1595	-431	966	-1830	-1437	-185	-1449	1092	-574	-754	-207	-1601	213	-206	-458	-2067	159	-1877	-1296	417
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(G)	-2594	-2690	-3034	-3623	-4320	-3747	-3462	-4781	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-2222	418
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	-632	-1230	-2074	-2144	-2996	-1453	-2116	-2631	-2128	-2928	-2213	-1658	-3618	-2006	-2221	-852	1302	-1931	-3185	-2917	419
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(A)	-438	-1472	-2845	-3040	-3287	-1728	-2735	-2840	-3028	-3257	-2662	-2236	-2447	-2798	-2944	-1216	-1387	-2183	-3405	-3320	420
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(R)	-1454	-2316	-1789	-678	-2634	-2232	-426	-2292	2261	-2200	-1473	-940	-2240	-17	-2622	-1386	-1270	588	-2249	-1960	421
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(V)	-1771	-1603	-3750	-3689	-2037	-3050	-3231	433	-3479	-1154	-1076	-3246	-5399	-3332	-3437	-2628	-1917	-3538	-3074	-2677	422
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(F)	-3342	-2776	-4026	-4232	-4354	-3545	-1431	-2315	-4038	-1801	-1900	-3299	-5760	-3350	-3645	-3490	-3420	-2566	-739	349	423
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(D)	-1572	-3428	-2573	2447	-3613	-1583	-879	-3513	-1050	-3390	-2684	1292	-2063	-538	-1855	-1253	-1623	-3000	-3585	-2609	424
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-879	-1989	1499	-177	-3045	1600	-939	-2843	-904	-2657	-2046	-438	-1922	-591	-1483	2171	-1044	-2226	-3072	-2372	425
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(E)	-2641	-3308	-896	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-2128	-4018	-3555	-1531	-2959	-1842	-2580	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	426
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(Q)	-705	-1925	-99	2112	917	-1534	-288	-1824	42	-1842	-1054	-210	-1709	-2163	-420	-611	-656	-1502	-1997	-1291	427
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(H)	-669	-2046	1450	1525	-2349	-1405	1839	-2103	181	-2058	-1157	-37	-1569	272	-349	713	620	-1662	-2240	-1537	428
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(C)	1626	2878	-2671	-2107	1264	-968	-1091	233	-1777	-334	250	-1872	-2128	-1459	-1691	-1096	-529	1209	-1066	-704	429
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(M)	-2042	-1634	-4379	-3626	-659	-3976	-2899	2765	-3546	1204	-3085	-3605	-3634	-2896	-3318	-3183	-1961	195	-2135	-2056	430
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	412	-2447	1356	-2379	-2747	-1477	-445	-2527	-243	-2477	-1622	-107	855	-36	-831	-730	-894	-2073	-2658	-1906	431
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	2822	-1031	-2418	-2539	-3226	1898	-2354	-2941	-2526	-3229	-2379	-1722	-2026	-2302	-2634	-654	-848	-1983	-3415	-3226	432
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(I)	-1772	-1325	-4307	-3877	-1405	-3993	-3393	-2936	-3703	820	-217	-3632	-3761	-3400	-3692	-3260	-1742	2333	-2838	-2525	433
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

Tabla 1

3(L)	-875	-1834	-575	959	-1531	-1769	-525	-1179	-135	-1884	-625	-547	-1931	1405	-450	-909	-816	-1074	-1893	-1383	434
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	1705	-1825	-180	949	-2518	-1410	-359	-2041	-53	-2057	-120	1001	-1652	52	-561	1232	-595	-1608	-2238	-1643	435
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-1074	-2458	2381	60	-2921	1927	-653	-2710	463	-2375	-880	-271	-1918	-276	688	-915	-1100	-2245	-2845	-1214	436
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-688	-2117	785	866	-2469	-1529	-187	-2189	2380	-2106	-1221	-162	-1861	256	1134	-553	-619	-1760	-2240	-1607	437
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-2019	-1582	-4380	-3941	-1000	-4086	-3253	-3295	-367	1100	145	-3736	-3783	-3222	-3556	-3273	-1976	657	-2517	-2289	438
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(Q)	-490	-1797	-363	171	-2078	-1457	1762	-1779	1157	-1780	-905	165	-1550	1796	48	-306	-422	725	-1966	-1366	439
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(A)	1954	-1835	1733	-180	-2714	-1429	-805	-2439	-679	-2518	-1698	-430	1775	-448	-1211	-736	-894	-1923	-2765	-2117	440
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(G)	-2594	-2890	-3304	-3623	-4328	3747	-3462	4781	-3953	4871	4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	441
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	-1736	-3455	3493	97	-3737	-1646	-1070	-3753	-1363	-3647	-3018	1602	-2204	-750	-2218	-1420	-1838	-3213	-3756	-2780	442
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(V)	-1721	-1302	-4229	-3874	-1705	-3694	-3582	1607	-3706	-582	-513	-3610	-3766	-3559	-3767	-3209	-1725	3294	-3158	-2712	443
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(V)	594	-988	-3391	-2911	-1164	-2688	-2187	845	-2637	765	-154	-2578	-2962	-2387	-2622	-2074	-1235	2890	-2084	-1724	444
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(V)	-1771	-1803	-3750	-3589	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1076	-3246	-3399	-3382	-3437	-2620	-1917	3536	-3074	-2677	445
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(I)	-1754	-1308	-4255	-3867	-1434	-3978	-3377	-2661	-3597	652	-247	-3617	-3754	-3406	-3679	-3243	-1725	2373	-2652	-2526	446
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(R)	-2957	-3022	-3318	-2735	-3796	-2998	-1963	-3912	-346	-3631	-3157	-2611	-3260	-1724	-4056	-3025	-2913	-3650	-3096	-3185	447
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(Y)	-1321	-1438	-1964	-1608	2186	527	-450	-1117	-1481	-1211	-693	1178	-2522	-1217	-1665	-1513	-1275	-1021	-196	-3178	448
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(C)	-675	2205	-2544	972	-572	-2236	-1121	1373	-167	679	261	-1700	-2270	-1400	-1698	-1311	-621	1601	-1150	-790	449
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-467	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	450
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(P)	-2931	-2878	-3420	-3706	-4181	-2925	-3469	-4621	-3959	-4490	-4165	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	451
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	-1060	-2058	-1088	-460	-2432	-1917	-357	-1970	-2901	-1976	-1220	-652	-1990	1336	367	-699	-946	536	-2145	-1717	452
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-467	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	453
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-467	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	454
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(P)	-2931	-2878	-3420	-3706	-4181	-2925	-3469	-4621	-3959	-4490	-4165	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	455
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-467	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2981	-4004	-3668	-4222	456
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(W)	-2406	-2296	-3636	-3594	-1525	-3105	-2624	-1047	-3121	-596	-5043	-3293	-3425	-3046	-2996	-2511	-2552	-1396	-2513	-2207	457
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(F)	-1859	-2241	-2022	-1849	-3165	-2242	-1373	-3000	-450	-2936	-2274	-1824	-3458	-1088	2098	-1730	-1750	-2583	-2816	-2613	458
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(E)	-2841	-3308	-893	-3722	-3686	-2458	-2043	-4105	-2128	-4016	-3558	-1531	-2959	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	459
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(M)	-2406	-2298	-3633	-3594	-1525	-3103	-2824	-1047	-3121	-596	-5043	-3293	-3425	-3046	-2998	-2917	-2552	-1388	-2513	-2207	460
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(L)	-2871	-2457	-4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-3734	-3130	31	-3935	-3797	-3236	-3484	-3713	-2869	-1136	-2394	-2220	461
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(K)	1358	-1491	-763	-332	-2515	-1417	-551	-1988	-1788	-2038	-1221	-500	-1721	-150	470	1631	-587	-1532	-2299	-1754	462
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(P)	-1500	-1738	-2514	-2380	-1555	-2358	-2022	-1128	-2063	1224	-841	-2189	-3436	-2051	-2129	-1822	-1674	-1231	-2290	-1878	463
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	-351	-974	-2208	-2165	-2894	-1237	-2041	-2561	-1215	-2853	-2048	-1539	-1948	-1923	-2218	1543	-3230	-1758	-3139	-2834	464
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1840	-2474	-3294	-2886	-3497	-2780	-1973	-2360	-2432	-2703	3465	-1316	-2413	-3310	-3025	465
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	2706	-986	-2433	-2144	-1502	-1684	-1705	-700	-1858	-958	2744	-1705	-2188	-1713	-1932	-863	-862	552	-2145	-1754	466
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(I)	-2103	-1659	-451	-3992	-889	-4152	-3233	-3082	-3723	1619	280	-3801	-3788	-3171	-3557	-3432	-2048	487	-2418	-2265	467
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(I)	-1751	-1312	-4317	-3954	-1733	-4027	-3703	-3225	-3314	556	-498	-3712	-3859	-3853	-3877	-3344	-1754	2110	-3216	-2787	468
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-2594	-2692	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3353	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3778	-2639	-2981	-4004	-3568	-4222	469
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(K)	1641	-2633	-323	914	-2415	-1565	-296	-2097	-2062	-2030	-1233	-257	-1756	125	-133	-646	-702	-1707	-2238	-1657	470
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	471
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(L)	-1699	-1807	-2268	-1925	-830	-2795	-1551	-455	-1225	-2510	90	-1958	-2845	1927	-1308	-2067	-1651	-846	-1841	-1454	472
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3746	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	473
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(D)	-853	-2415	-2115	1717	-2702	-1468	-378	-2484	1085	-2417	-1546	-34	-1732	41	-399	696	-824	-2025	-2694	-1839	474
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(S)	-892	-1780	-931	-688	-2757	-1643	-830	-2472	1571	-2492	-1708	-798	-2016	-468	-365	2676	-1004	-1981	-2598	-2130	475
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(C)	-1135	3503	-3703	-3406	-1670	-2549	-2675	653	-3101	-916	-657	-2727	-2925	-2870	-3030	-1668	-1288	2927	-2619	-2222	476
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(A)	-2594	-1035	-2434	-2530	-3236	2290	-2365	-2954	-2627	-3240	-2389	-1719	-2027	-2302	-2637	-656	-851	-1991	-3423	-3234	477
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(L)	-2632	-2552	-4630	-4185	1767	-4324	-2442	-61	-3879	-2789	563	-3633	-3823	-2970	-3513	-3609	-2518	-736	-1527	-945	478
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-2073	-1632	-4434	-3975	-911	-4130	-3238	-3164	-3706	1451	244	-3779	-3785	-3197	-3557	-3413	-2021	546	-2449	-2273	479
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(T)	-1213	-1674	-2755	-2906	-3183	-1922	-2659	-2698	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2709	-2753	-1463	-3819	-2197	-3286	-3156	480
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(D)	-2784	-3432	-4616	-1200	-4140	-2466	-2197	-4305	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2009	-3232	-2593	-2938	-4046	-3710	-3552	481
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	482
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
7(R)	-2957	-3022	-3313	-2735	-3796	-2998	-1568	-3912	-846	-3631	-3157	-2611	-3280	-1724	-4056	-3026	-2913	-3650	-3096	-3185	483
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
3(F)	-3342	-2776	-4026	-4232	-4354	-3545	-1431	-2315	-4038	-1801	-900	-3299	-3780	-3350	-3645	-3490	-3420	-2586	-739	349	484
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
3(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3185	-1640	-2474	-3294	-2666	-3497	-2780	-1973	-2360	-2493	-2703	3465	-1316	-2413	-3310	-3025	485
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
3(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	486
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
1(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	487
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
2(T)	-358	-676	-2225	-2229	-2900	-1242	-2074	-2560	2170	2873	-2054	-561	-1958	-1968	-2247	1110	3375	-1760	-3152	-2850	488
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
3(Y)	-3402	-2632	-3441	-4011	1064	-3924	3388	-2526	-354	-1998	-973	-2625	-3821	-2664	-3170	-3135	-3280	-2619	3420	-3756	489
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
4(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	490
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
5(M)	-2322	-1904	-4636	-3951	2367	-4112	-2676	67	3649	2034	3158	-3710	-3633	-2803	-3311	-3209	-2204	588	-1794	-1586	491
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
3(V)	-1771	-1600	-3750	-3689	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1076	-3246	-3369	-3332	-3437	-2628	-1917	-3536	-3074	-2677	492
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													
7(V)	-1771	-1600	-3750	-3689	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1076	-3246	-3369	-3332	-3437	-2628	-1917	-3536	-3074	-2677	493
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378	*													

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

5(G)	-2564	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3658	-4222	494
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(H)	-3205	-3079	-2723	-2890	-2110	-3048	-5295	-4136	-2917	-3813	-3561	-2886	-3482	-2833	-2620	-3291	-3356	-3695	-2337	-1881	495
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(V)	-1754	-1297	-4529	-3968	-1770	-4053	-3752	2604	-3940	-621	-549	-3728	-3676	-3699	-3917	-3370	-1748	-2659	-3278	-2829	496
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(A)	-2567	-828	-2477	-2155	-1837	-1488	-1723	-743	-1941	-1564	-954	-1607	-2033	-1725	-2034	-738	1178	1108	-2310	-1972	497
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(P)	-2931	-2878	-3420	-3708	-4181	-2925	-3463	-4621	-3859	-4490	-4168	-3491	-4225	-3781	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4084	498
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-2641	-3308	-486	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-2128	-4018	-3555	-1531	-2959	-1842	-2560	-2479	-2757	-3722	-3563	-1385	499
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(A)	-3436	-1472	-2845	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2652	-2236	-2447	-2798	-2944	-1216	-1367	-2183	-3405	-3320	500
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(Y)	-866	-976	-1863	-1331	1353	-2145	1318	-556	-1116	-777	-173	-1242	-2197	1714	-1301	-1173	-802	888	-445	-2749	501
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(D)	417	-1831	-1647	1094	-2035	-486	-353	-1618	-107	-1820	-1019	-199	-1698	30	623	603	643	1619	-2154	-1520	502
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	503
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(G)	-2594	-2690	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2639	-2981	-4004	-3668	-4222	504
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	492	-1190	-705	-181	-1475	311	-333	-1099	-61	71	-508	570	1113	-6	506	450	1123	-835	-1660	-1181	505
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(I)	-2051	-1748	-3671	-3340	-1678	-3532	-3289	-3594	-3584	-659	-630	-3582	-3674	-3445	-3521	-3094	-2148	449	-2677	-2493	506
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-3103	-1036	-2445	-2572	-3223	-1051	-2389	-2930	-2850	-3226	-2381	-1739	-2034	-2327	-2648	-664	-857	-1981	-2412	-3228	507
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2238	-1892	-3111	-3400	301	-3520	-1210	-542	-2949	-2594	-35	-2786	-3393	-2438	-2750	-2747	-2165	-348	573	2562	508
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(V)	-1757	-1387	-4101	-3681	-174	-3714	-3031	893	-3410	1254	60	-3407	-3585	-3094	-3354	-2884	-1743	-3014	-2536	-2219	509
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(Q)	-982	-2251	-666	971	-2711	-1822	-251	-2340	1444	-2194	-1366	-484	-1886	-2646	1532	-858	-863	-1988	-2245	-1765	510
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(E)	-1162	-2771	2137	-2238	-3046	-1526	-626	-2949	-546	-2792	-1983	-145	-1903	-242	-1132	-940	1398	-2383	-2990	-2169	511
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(G)	-1707	-2684	1591	-614	-3783	-3190	-1613	-3785	-1887	-3775	-3119	-915	-2458	-1358	-2539	-1610	-1924	-3150	-2636	-3124	512
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(O)	-2784	-3432	-4076	-1200	-4140	-2466	-2197	-4505	-262	-4365	-3956	-1851	-3014	-2039	-3232	-2593	-2838	-4046	-3710	-3552	513
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(M)	-472	-522	-1819	-1236	-468	-1679	-687	1519	-996	568	1677	-1154	-1937	836	-1131	1079	413	102	-957	-585	514
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(O)	-1781	-1312	-4317	-3894	-1713	-1027	-3703	-3226	-3814	566	498	-3712	-3869	-3663	-3877	-3644	-1754	2110	-3216	-2787	515
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(T)	782	-1467	55	1829	-2202	-1428	-709	-1751	472	-1993	-1203	-526	-1787	-368	902	-617	-2688	-1400	-2333	-1783	516
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(I)	-1766	-1333	-4283	-3923	-1635	-3667	-3619	-3368	-3759	473	437	-3672	-3822	-3576	-3804	-3285	-1764	1695	-3126	-2717	517
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

2(D)	-2784	-3432	-4015	-1200	-4140	-2466	-2197	-4505	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2039	-5232	-2593	-2938	-4046	-3770	-3552	518
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-2785	-1451	-1035	-913	-2506	-1504	-1143	-2174	-794	-2337	-1613	-946	-1993	2040	-1061	-809	910	-1703	-2633	-2156	519
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(H)	-615	-1683	1444	66	-1683	163	2650	-1558	-86	-1891	-891	-223	-1680	31	577	-571	-586	1267	-2007	-1397	520
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(K)	-654	-2006	-546	42	-2276	-1581	-133	-2086	-393	-1937	-1107	1132	-1656	1043	1058	-540	1180	-1660	-2173	-1532	521
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
6(N)	-933	-2085	-946	-284	-2472	-1822	-263	-2090	1711	76	-1204	1918	-1876	175	1799	-841	-817	-1755	-2132	-1693	522
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(E)	-416	-987	-843	-1107	-1070	-1583	-338	-623	-183	879	-172	-489	-1679	-94	-566	544	813	255	-1379	-905	523
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(I)	-2258	-1804	-4568	-4084	706	-4259	-3231	2527	-3807	2292	465	-3823	-3814	-3118	-3570	-3544	-2181	190	-2303	-2237	524
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(Q)	-477	-1909	958	282	-2211	-1389	1484	-1953	285	-1921	-018	32	-517	-2318	-225	630	559	-1525	-2110	-1430	525
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
0(L)	-2127	-1743	-4402	-3795	1257	-3918	-2674	149	-3492	2527	2164	-3553	-3509	-2714	-313	-3093	-2019	570	-1670	-1818	526
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(N)	-723	-2217	958	236	-2518	-1466	611	-2279	1719	-2217	-1334	2286	-1666	166	-401	-570	-677	-1837	-2382	-1678	527
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(V)	-1754	-1297	-4330	-3968	-1770	-4053	-3752	2623	-384	-620	-545	-3729	-3876	-3699	-3918	-3371	-1746	-2846	-3277	-2830	528
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(S)	1545	-674	-2003	-1825	-2867	-1206	-1790	-2580	-1788	-2795	-1932	-1352	1826	-1596	-1999	2362	-672	-1755	-3057	-2721	529
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

4(D)	-1776	-3649	-3523	1369	-3838	-642	-1031	-3788	-322	-2650	-3029	-245	-2192	-711	-2201	-1425	-1855	-3264	-3821	-2816	530
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	423	-2950	1944	-2336	-3223	-1545	-713	-3047	-715	-2979	2196	-161	-1968	347	-1403	-1043	-1314	-2568	-5177	-2316	531
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(E)	-2641	-3308	-895	-3732	-3966	-2458	-2043	-4105	-2128	-4016	-3555	-1531	-2959	-1842	-2560	-2479	-2750	-3722	-3563	-3385	532
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(L)	-2339	-1899	-4619	-4042	1570	-2204	-2649	1440	-3758	-2536	676	-3825	-3700	-2902	-3418	-3418	-2226	-382	-1924	-1778	533
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(A)	-2338	-1990	-241	938	-2356	-657	-423	-2061	954	-2103	-1286	-301	-1791	-26	-375	-717	-784	-1691	-2330	-1728	534
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(R)	524	-2098	-789	-146	-2504	-1729	1632	-2153	1229	-2054	-1204	-379	-1789	1328	-2343	-715	-724	-1774	-2150	-1637	535
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
8(R)	-2957	-3022	-3118	-2735	-3736	-2698	-1969	-3912	-846	-3631	-3157	-2611	-3280	-1724	-4056	-3026	-2913	-3650	-3096	-3185	536
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(R)	-1835	-2713	-2327	-1192	-3484	-2502	-481	-2656	2144	-2544	-1842	-1161	-2453	1332	-3023	-1770	-1619	-2599	-2421	-2259	537
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(A)	-2335	-1714	-553	857	-2769	-1545	-218	-2333	-1108	-2591	-1873	-603	-2065	-934	-1532	-654	-1103	-1872	-2898	-2374	538
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(A)	-4251	-1874	-176	1227	-2177	-1392	-109	-1909	277	-1891	-995	1134	-1522	1218	228	-361	562	-1492	-2090	-1419	539
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(W)	-805	-687	-2581	-2028	138	-2236	-697	897	-1681	421	141	-1645	-2282	-1398	-1627	-1315	636	-90	-4479	1809	540
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(H)	-408	-1801	-274	1284	-2096	-1385	1500	-1822	1168	-1802	-898	-33	-1476	1381	-132	-303	595	221	-1996	-1339	541
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(Q)	-650	-1737	-627	-72	-1981	-1615	-209	-1625	1223	392	-866	-318	1222	2126	50	-599	-572	-1326	-1932	-1354	542
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(P)	-2931	-2678	-3420	-3705	-4181	-1925	-3463	-4621	-3859	-4490	-4165	-3491	-4225	-3731	-3695	-3182	-3279	-4087	-3594	-4064	543
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-324	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	2195	-924	-968	-546	-1397	-1356	-583	-812	-365	-1167	-497	-618	-1667	1324	694	-483	-404	462	-1703	-1242	544
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-19	-6804	-7846	-894	-1115	-428	-1981														
3(P)	411	-1017	-1865	-1618	-1600	-1590	-1411	-962	-1400	493	-755	-1394	-3155	-1323	-1577	-647	-786	-733	-2111	-1716	545
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(R)	-1612	-2397	-2037	-1033	-2897	-2352	-459	-2365	2184	666	-1620	-1051	-2394	-51	-2607	-1646	-1396	-2143	-2262	-2074	546
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
1(Y)	712	-796	-2334	-1883	-370	-2028	-906	-143	-1307	-693	-131	-1587	-2243	-1333	-1656	-1178	-771	1114	-965	-3479	547
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
2(T)	-527	-1663	1091	-27	-2915	-1379	-443	-2033	-151	-2091	-1218	-282	557	-41	-650	1128	-2077	-1576	-2321	-1690	548
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(R)	-2957	-3022	-3618	-2735	-3796	-2998	-1968	-3912	-946	-3631	-3157	-2611	-3260	-1724	-4056	-3028	-2913	-3650	-3096	-3185	549
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
4(G)	-2594	-2890	-3304	-3623	-4328	-3747	-3462	-4761	-3953	-4671	-4212	-3320	-3352	-3748	-3779	-2839	-2961	-4004	-3668	-4222	550
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
5(V)	-1747	-1296	-4310	-3946	-1756	-4023	-3716	2215	-3913	-615	-540	-3705	-3860	-3670	-3887	-2339	-1741	-3087	-3252	-2806	551
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
3(L)	-2871	-2457	-4231	-4103	-1033	-3603	-3165	-541	-3734	-3190	-31	-3935	-3797	-3296	-3494	-3713	-2869	-1136	-2394	-2220	552
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
7(A)	2404	-890	-1925	-1629	-809	1275	-1415	-1282	-1490	392	-963	-1316	-1950	-1326	-1674	-654	-644	-952	-2167	-1810	553
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

9(N)	-2620	-2967	-2451	-2046	-3743	-1791	-1570	-3603	-3784	-3387	-2839	-2046	-3039	-1267	-465	-2604	-2536	-3331	-3001	-2988	554
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(Y)	-3621	-2707	-4176	-4424	-2950	-4049	-394	-2639	-4004	-1942	-1997	-2749	-3833	-2854	-345	-3249	-3499	-2690	-349	-4094	555
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	-3436	-1472	-2846	-3040	-3287	-1726	-2735	-2840	-3028	-3257	-2662	-2236	-2447	-2798	-2944	-1218	-1367	-2183	-3405	-3320	556
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(H)	-1741	-2627	-2070	-1046	-3303	-2401	2713	-2751	2478	-2476	-1755	-1061	-2375	-27	2378	-1621	-1497	-2477	-2379	-2161	557
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(L)	-1014	-876	-2866	-2408	-582	-2550	-1523	1721	-2079	-2042	345	-2114	-3581	-1775	-2028	454	-980	286	-1414	-1098	558
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(V)	633	-842	-2818	-2467	-1542	-1870	-1690	154	-2226	-1095	-617	-1632	-2326	-1995	-2259	-1126	-1070	-2769	-2180	-1826	559
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(S)	-787	-1522	-1486	-1172	-2714	-1589	-1112	-2500	-433	-2563	-1791	-1110	-2067	-796	1351	2816	-989	-1943	-2648	-2234	560
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(S)	-326	-1010	-1779	-1541	-2691	-1234	-1556	-2388	-1488	-2594	-1749	-1226	1196	-1330	-1747	2396	1967	-1662	-2876	-2496	561
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(A)	-3121	-934	-2469	-2561	-3081	-1203	-2295	-2786	-2533	-3080	-2234	-1669	-1953	-2234	-2533	936	-746	-1844	-3331	-3090	562
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(S)	-897	-1462	-2333	-2543	-3188	-1640	-2474	-3294	-2586	-3497	-2793	-1973	-2380	-2482	-2703	3465	-1316	-2413	-3370	-3025	563
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(R)	-586	-1873	-519	979	-2168	-1543	-123	-1669	1290	353	-980	-202	-1622	314	1888	-491	782	-1495	-2024	-1439	564
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														
9(G)	-2594	-2930	-3004	-3623	-4326	-3747	-3462	-4781	-3953	-467	-4212	-3320	-3352	-3740	-3778	-2639	-2981	-4094	-3668	-4222	565
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-16	-7108	-8150	-894	-1115	-701	-1378														

ES 2 521 675 T3

Tabla 1

3(C)	2804	3772	3'85	3198	2739	-1303	-2462	2085	2382	2628	-1924	-1927	-2044	-2547	-2727	-661	-799	-1463	-3096	2886	566	
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-16	-7'08	-8150	-894	-1115	-701	-1378															
3(V)	-1771	-1603	-3750	-3889	-2037	-3050	-3231	403	-3479	-1154	-1078	-3246	-3399	-3332	-3437	-2628	-1917	-3536	-3074	-2677	567	
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-16	-7'08	-8150	-894	-1115	-701	-1378															
3(T)	-1213	-1674	-2755	-2906	-3162	-1922	-2659	-2898	-2788	-3105	-2612	-2311	-2600	-2702	-2753	-1463	-3849	-2197	-3286	-3156	568	
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	-16	-7'08	-8150	-894	-1115	-701	-1378															
3(D)	-2784	-3432	-4016	-1200	-4140	-2456	-2197	-4505	-2621	-4365	-3956	-1551	-3014	-2099	-3232	-2593	-2938	-4046	-3710	-3552	569	
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
	21	-6715	-7757	-894	-1115	-701	-1378															
4(F)	-525	-445	-2202	-1627	-1946	-2001	-744	1247	-1343	952	561	1079	-2030	-1067	-362	-1067	465	338	74	-230	570	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de enzimas [2Fe-2S] DHAD que comprende:
- 5 a) consultar una o más secuencias de aminoácidos con un perfil modelo oculto de Markov preparado usando las proteínas de SEC ID N°: 164, 168, 230, 232, 298, 310, 344 y 346, en el que una coincidencia con un valor de E inferior a 10^{-5} proporciona un primer subconjunto de secuencias, por el cual dicho primer subconjunto de secuencias se corresponde con una o más proteínas relacionadas con DHAD;
- 10 b) analizar el primer subconjunto de secuencias que se corresponde con una o más proteínas relacionadas con DHAD de la etapa (a) para la presencia de tres cisteínas conservadas que se corresponden con las posiciones 56, 129 y 201 en la secuencia de aminoácidos de dihidroxi-ácido deshidratasa de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168), por el cual se identifican un segundo subconjunto de secuencias que codifican enzimas [2Fe-2S] DHAD; y
- 15 c) analizar el segundo subconjunto de secuencias de la etapa (b) para la presencia de aminoácidos conservados distintivos en las posiciones correspondientes a las posiciones en la secuencia de aminoácidos de DHAD de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168) que son ácido aspártico en la posición 88, arginina o asparagina en la posición 142, asparagina en la posición 208 y leucina en la posición 454, por el cual se identifican adicionalmente un tercer subconjunto de secuencias que codifica enzimas [2Fe-2S] DHAD.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además
- d) expresar un polipéptido que tiene una secuencia identificable por una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c) en una célula; y
- e) confirmar que dicho polipéptido tiene actividad de DHAD en la célula.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 que comprende además
- d) purificar una proteína codificada por una secuencia identificable por una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c); y
- e) confirmar que dicha proteína es una enzima [2Fe-2S] DHAD por espectroscopía UV-vis y EPR.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 que comprende además seleccionar una o más secuencias correspondientes a las secuencias de la enzima [2Fe-2S] DHAD bacteriana identificadas en una cualquiera o todas de las etapas a), b) y c).
5. El método de la reivindicación 2, en el que la célula carece de actividad de DHAD endógena.
6. El método de la reivindicación 4 que comprende además
- 30 d) expresar dichas una o más secuencias seleccionadas correspondientes a secuencias de la enzima [2Fe-2S] DHAD bacteriana en una célula; y
- e) confirmar que dicha secuencia de enzima tiene actividad de DHAD en la célula.
7. El método de la reivindicación 4 que comprende además
- d) purificar una proteína codificada por dichas una o más secuencias seleccionadas correspondientes a secuencias de la enzima [2Fe-2S] DHAD bacteriana, por el cual se produce una proteína purificada; y
- 35 e) confirmar que la proteína es una enzima [2Fe-2S] DHAD por espectroscopía UV-vis y EPR.
8. Una célula huésped microbiana que comprende al menos una enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga identificable por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga no es una enzima de espinaca.
9. La célula huésped microbiana de la reivindicación 8, en la que la enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga comprende:
- 40 (a) una secuencia de aminoácidos que coincide con un perfil modelo oculto de Markov preparado usando las proteínas de SEC ID N°: 164, 168, 230, 232, 298, 310, 344 y 346, con un valor de E inferior a 10^{-5} ;
- b) tres cisteínas conservadas que se corresponden con las posiciones 56, 129 y 201 en la secuencia de aminoácidos de dihidroxi-ácido deshidratasa de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168); y
- 45 c) aminoácidos conservados distintivos en las posiciones correspondientes a las posiciones en la secuencia de aminoácidos de DHAD de *Streptococcus mutans* (SEC ID N°: 168) que son ácido aspártico en la posición 88, arginina o asparagina en la posición 142, asparagina en la posición 208 y leucina en la posición 454.

10. La célula huésped microbiana de las reivindicaciones 8 ó 9, en la que la célula carece de actividad de DHAD endógena.
11. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la DHAD heteróloga es una DHAD bacteriana.
- 5 12. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que la DHAD heteróloga se deriva de *Streptococcus mutans* o *Lactococcus lactis*.
13. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la enzima [2Fe-2S] DHAD heteróloga tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 168 o SEC ID N°: 232 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad o al menos el 95 % de identidad con la misma.
- 10 14. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que la célula es una célula bacteriana, preferentemente un miembro de un género de bacterias seleccionado del grupo que consiste en *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*,
 15 un miembro de un género de levadura seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Pichia*, más preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.
15. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en la que la célula huésped comprende una ruta biosintética de isobutanol.
- 20 16. La célula huésped microbiana de la reivindicación 15, en la que la ruta biosintética de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:
- (i) piruvato en acetolactato;
- (ii) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato;
- (iii) 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato;
- 25 (iv) α -cetoisovalerato en isobutiraldehído; y
- (v) isobutiraldehído en isobutanol.
17. La célula huésped microbiana de la reivindicación 16, en la que
- la conversión de sustrato en producto de piruvato en acetolactato se cataliza por una acetolactato sintasa;
- 30 la conversión de sustrato en producto de acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato se cataliza por una cetol-ácido reductoisomerasa;
- la conversión de sustrato en producto de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato se cataliza por la DHAD heteróloga;
- la conversión de sustrato en producto de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído se cataliza por una α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada; y
- 35 la conversión de sustrato en producto de isobutiraldehído en isobutanol se cataliza por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.
18. La célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en la que la célula produce isobutanol.
19. Un método para la producción de isobutanol que comprende:
- 40 a) proporcionar la célula huésped microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18 en la que dicha célula huésped comprende una ruta biosintética de isobutanol; y
- b) cultivar la célula huésped de la etapa (a) en condiciones en las que se produce isobutanol.
20. Un método para la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato que comprende:
- 45 a) proporcionar el huésped microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18 y una fuente de 2,3-dihidroxiisovalerato; y
- b) cultivar la célula huésped microbiana de (a) en condiciones en las que el 2,3-dihidroxiisovalerato se convierte en

α -cetoisovalerato.

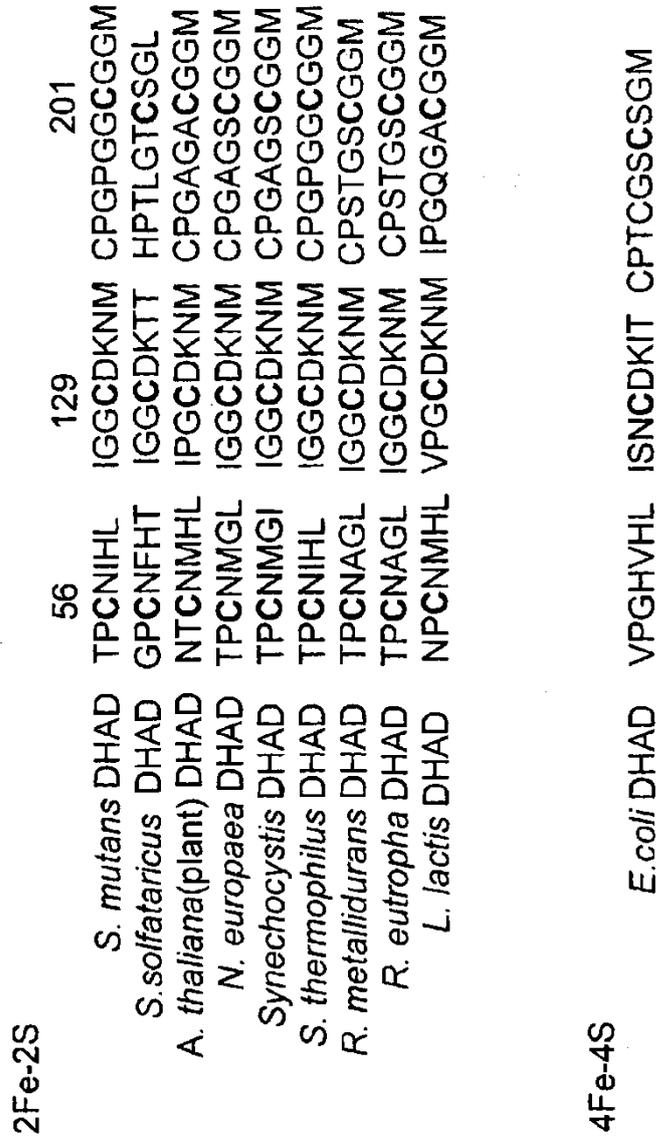


FIG. 1

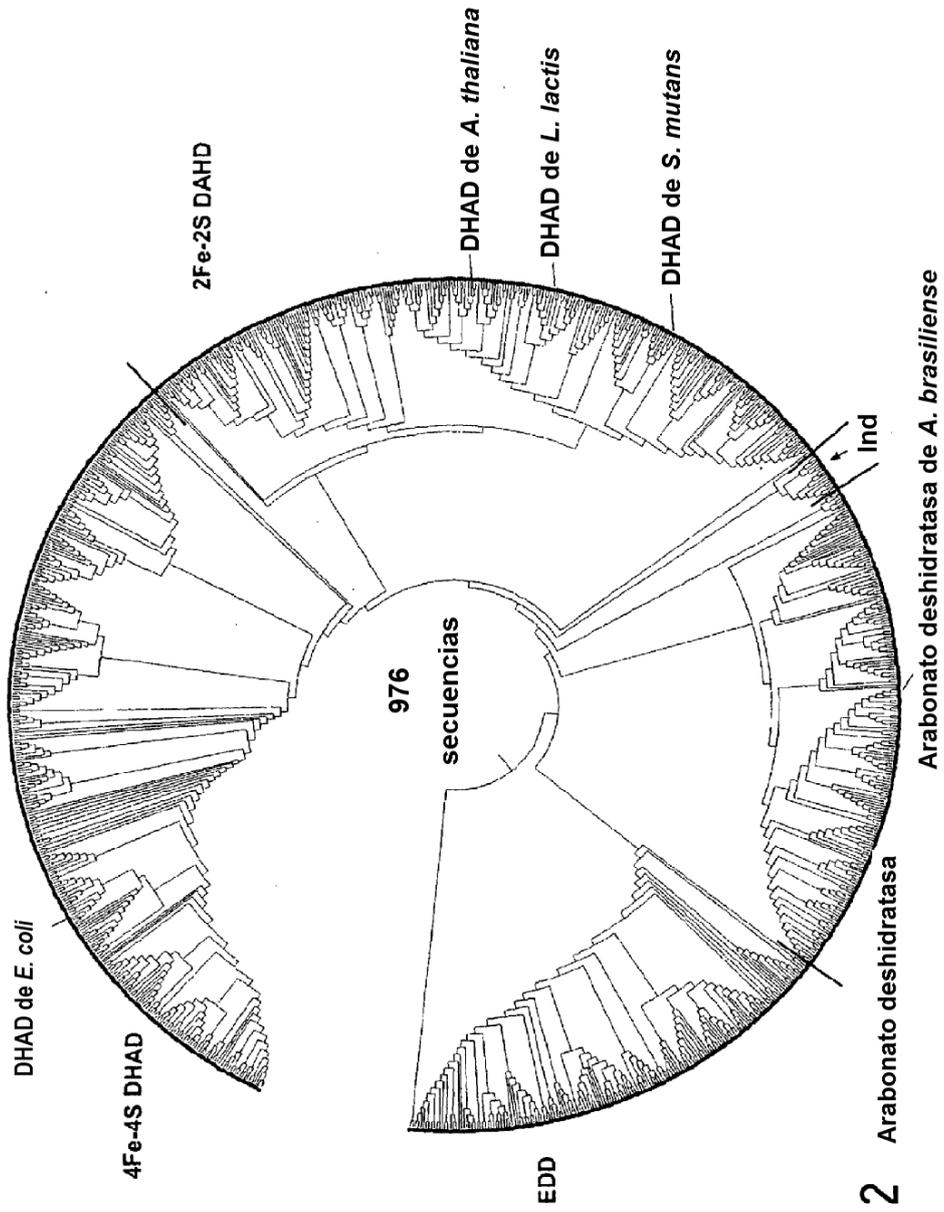


FIG. 2 Arabonato deshidratasa de *A. brasiliense*

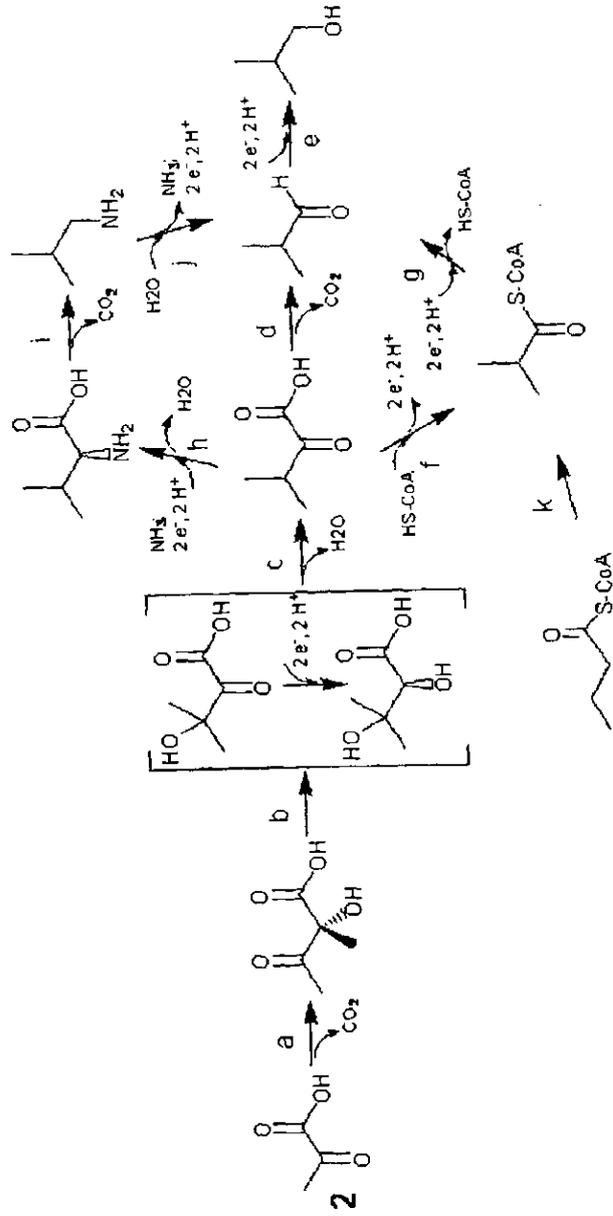


FIG. 3

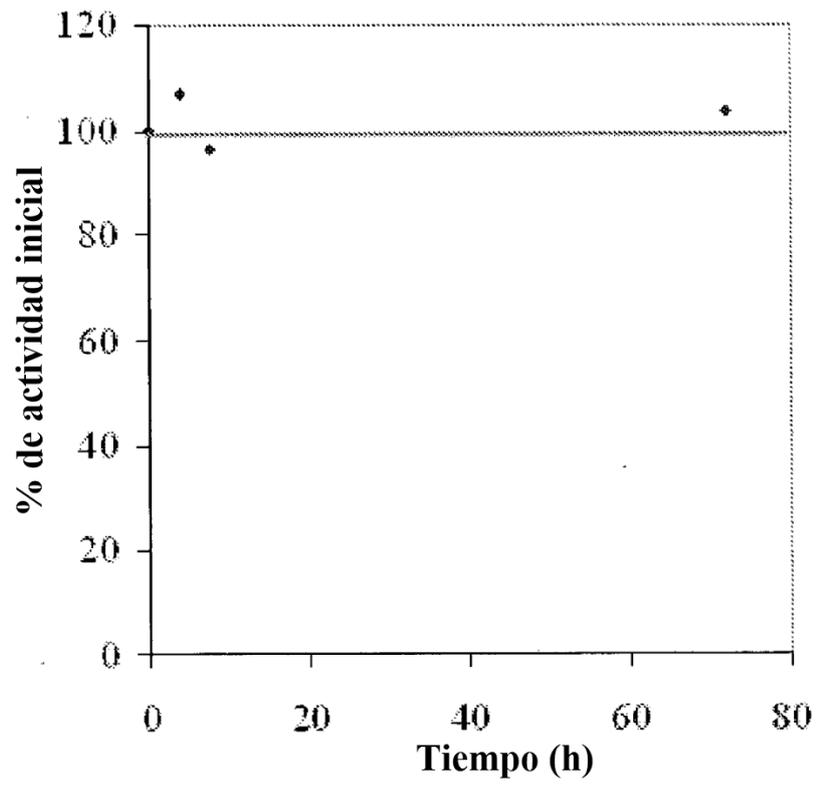


FIG. 4A

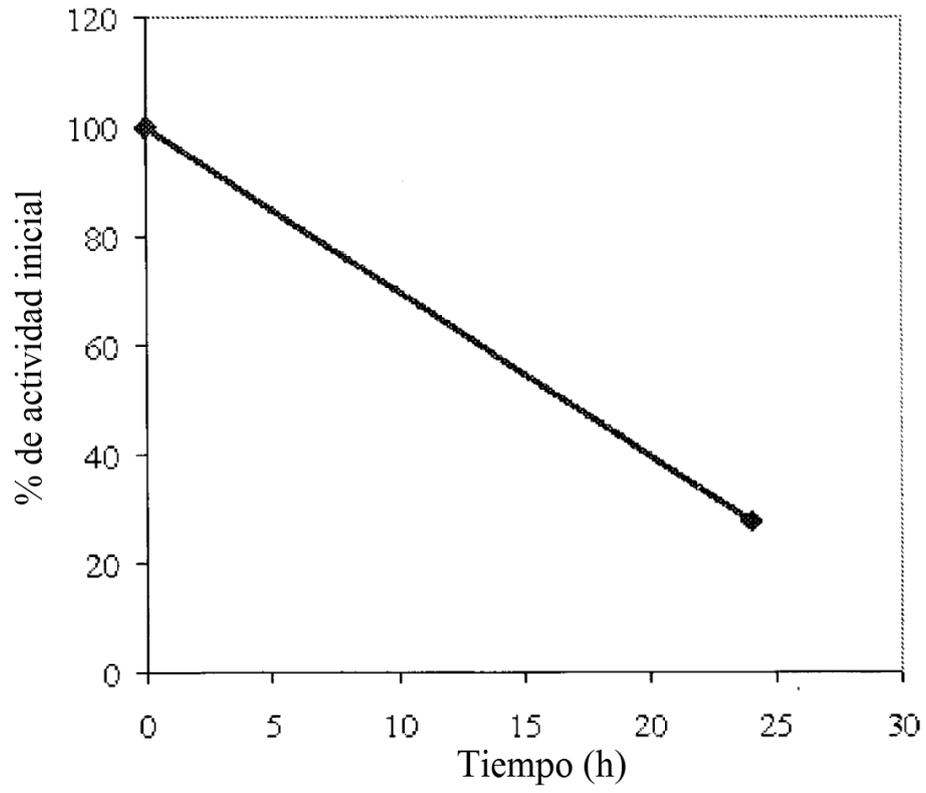


FIG. 4B

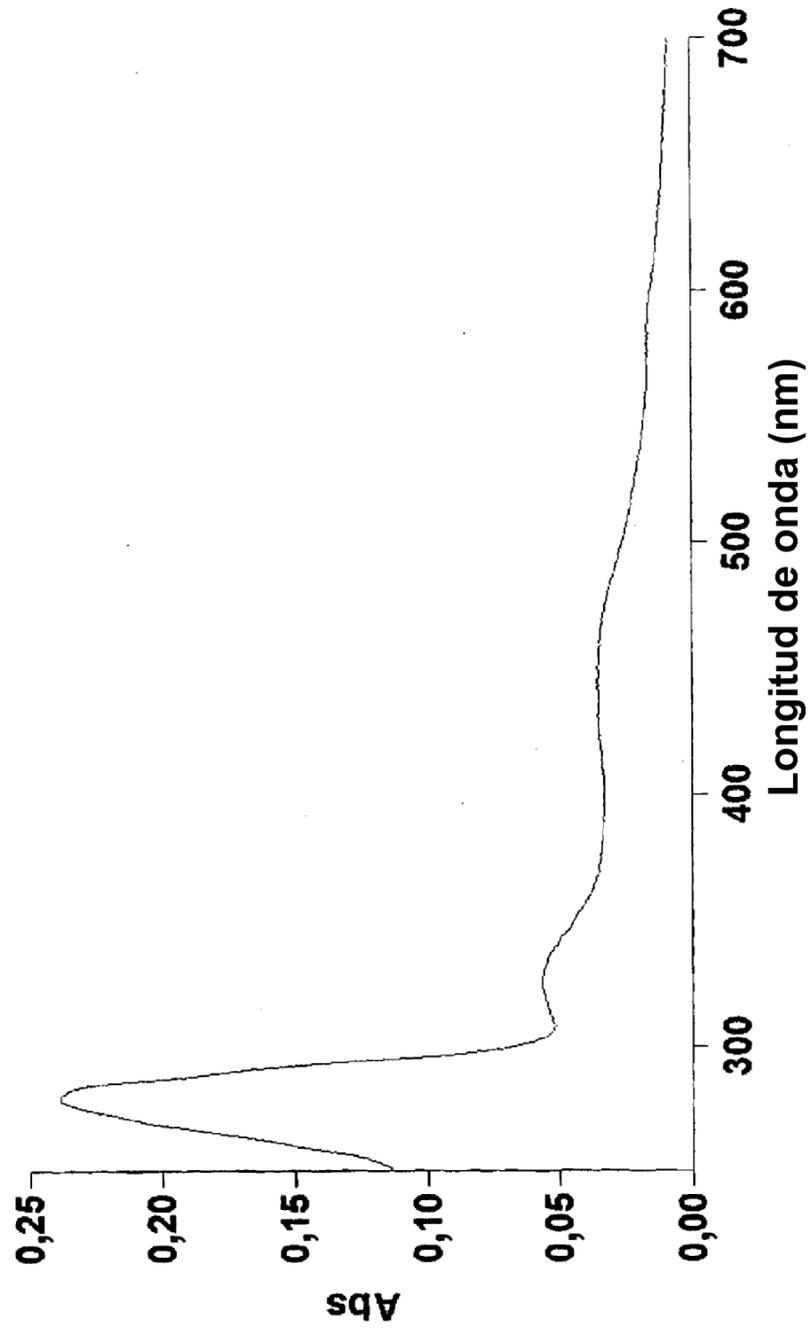


FIG. 5

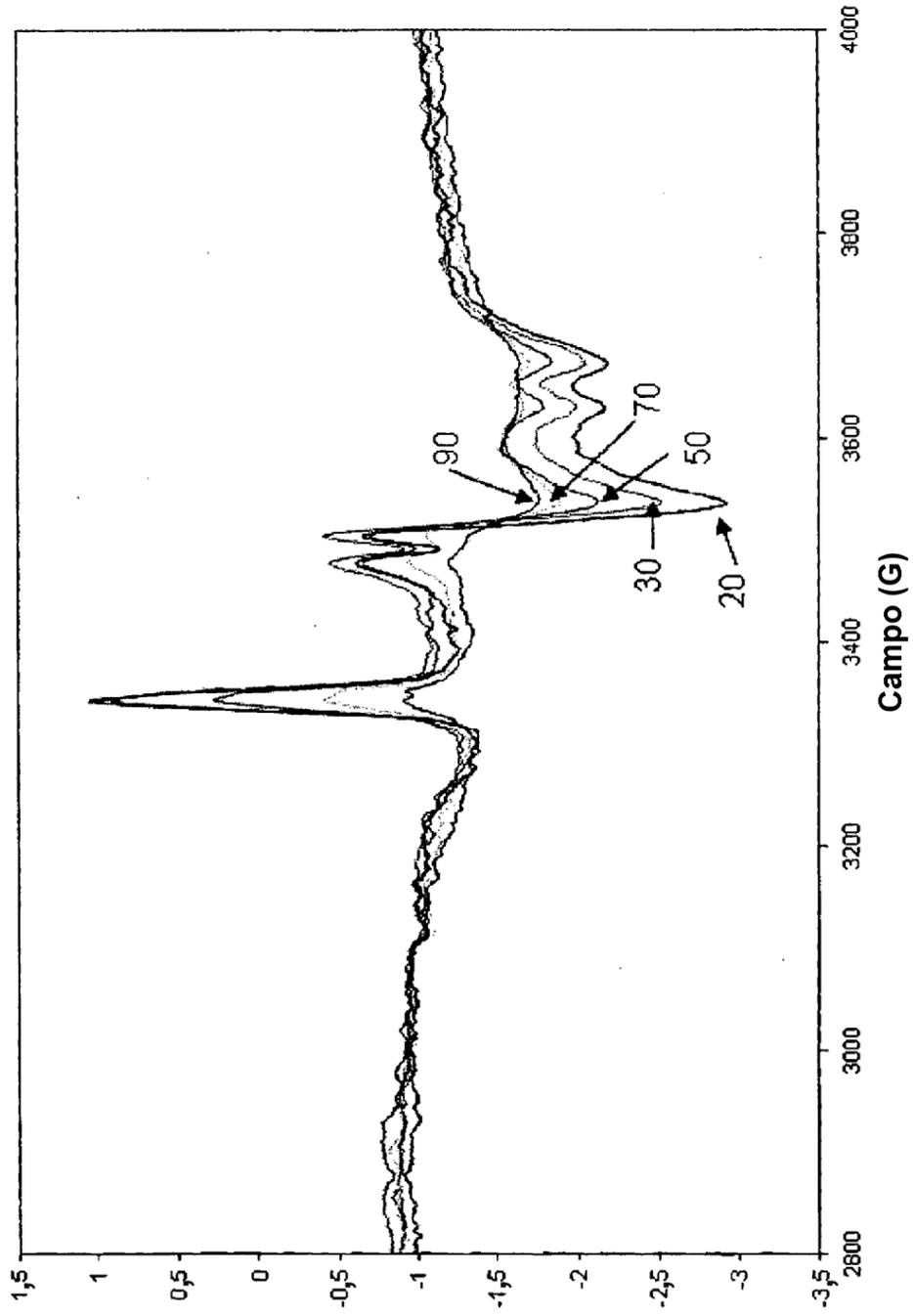


FIG. 6

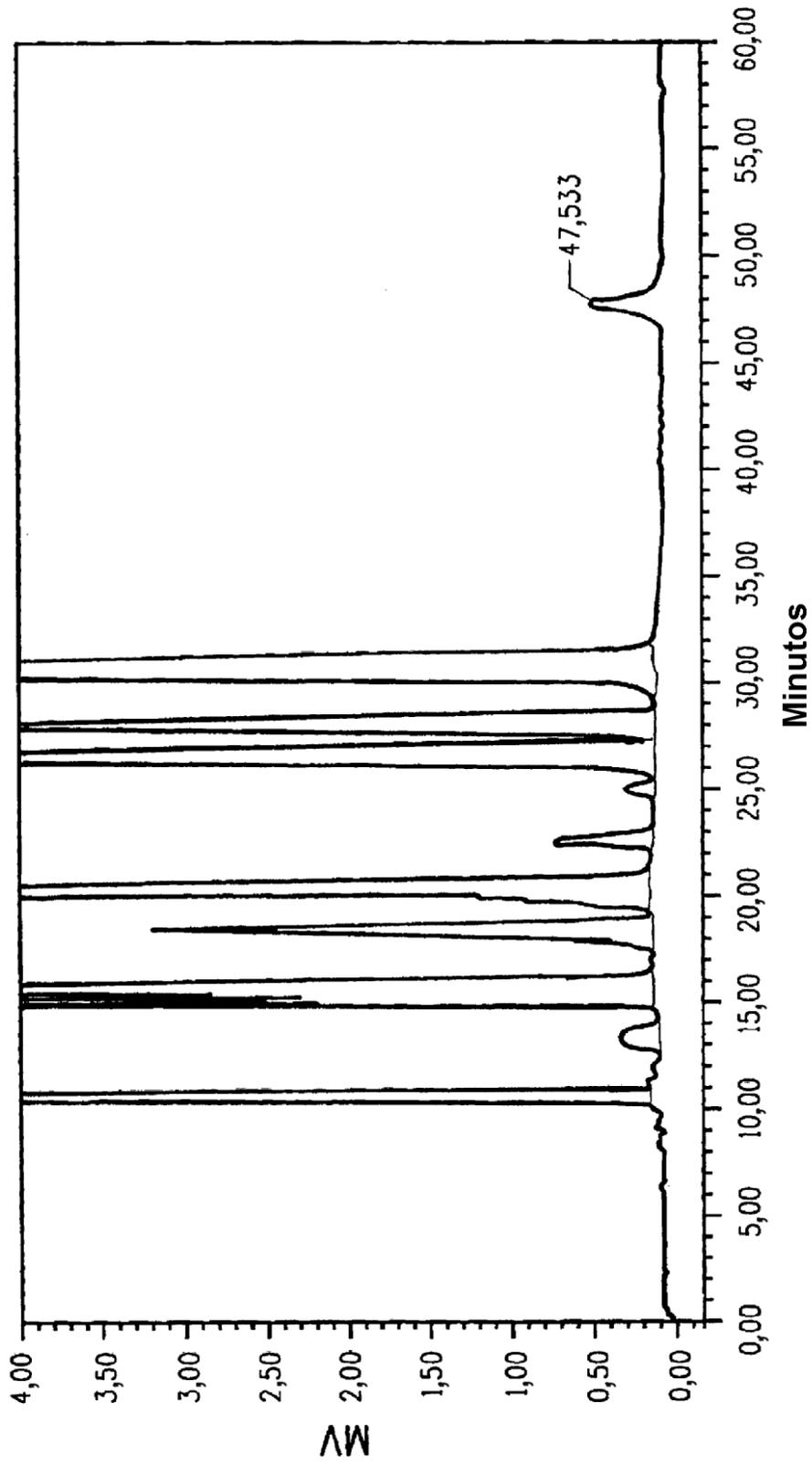


FIG. 7

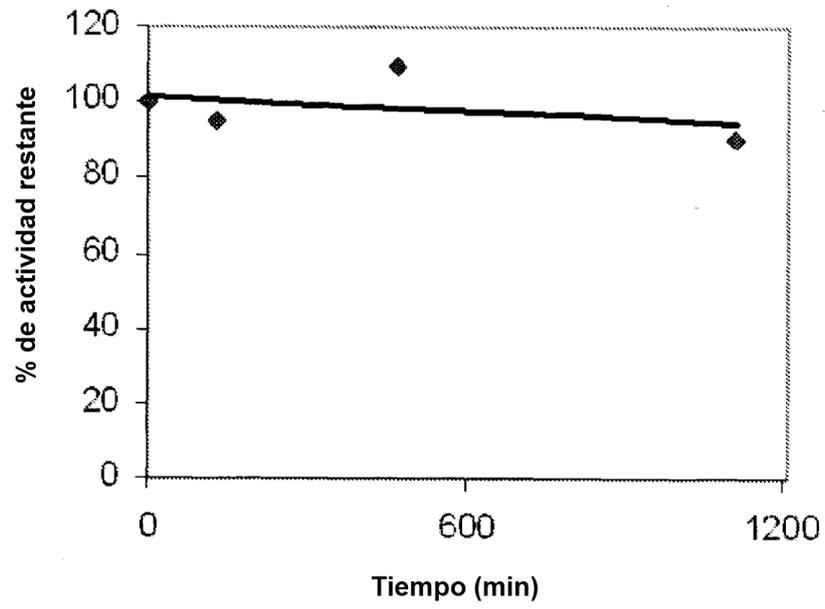


FIG. 8

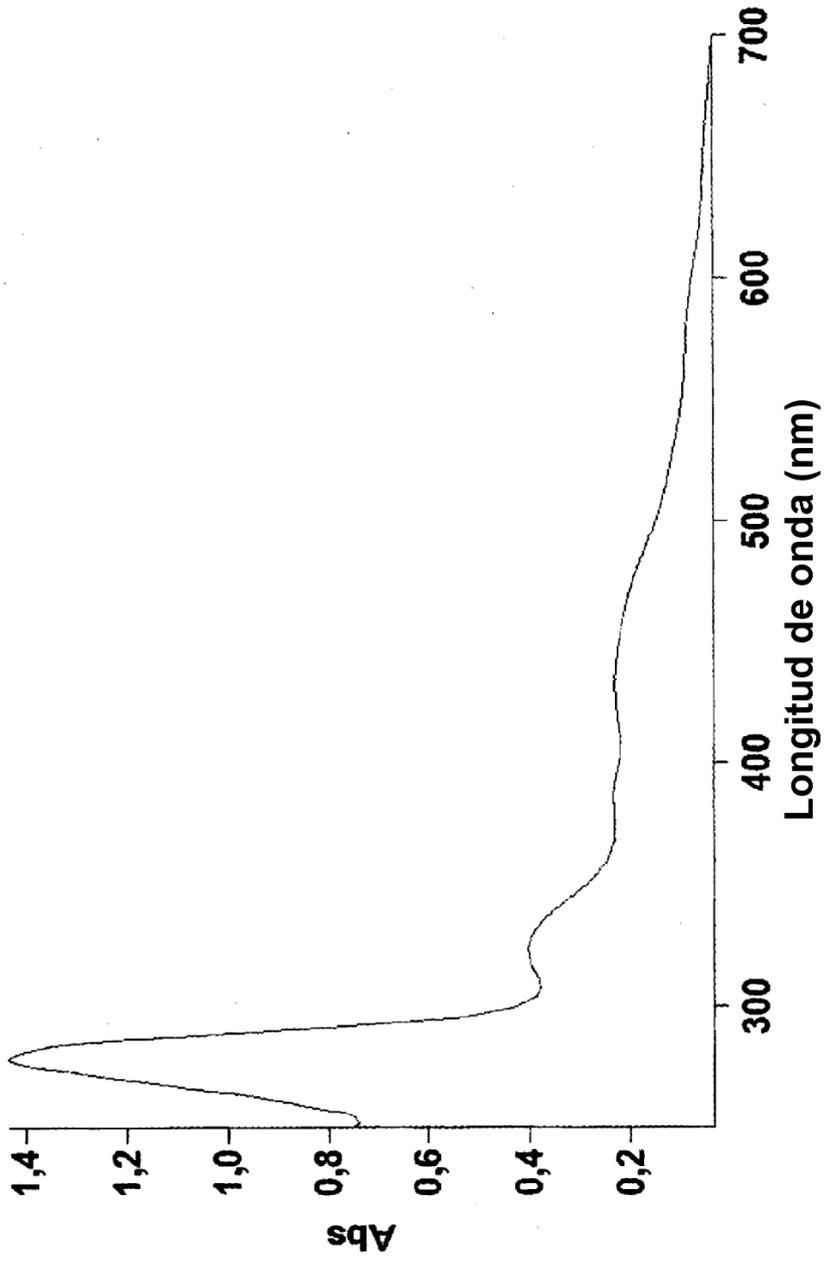


FIG. 9