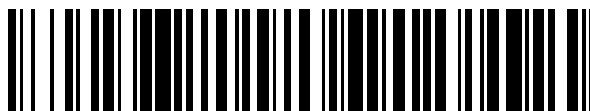


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 561**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2009** **E 09743546 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2283356**

54 Título: **Método de medición de los efectos de los componentes en la producción de especies reactivas del oxígeno en las células**

30 Prioridad:

06.05.2008 US 50871 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2014

73 Titular/es:

COLGATE-PALMOLIVE COMPANY (100.0%)
300 Park Avenue
New York, NY 10022 , US

72 Inventor/es:

TRIVEDI, HARSH, M. y
CHEN, DANDAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 524 561 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

Método de medición de los efectos de los componentes en la producción de especies reactivas del oxígeno en las células.

Antecedentes de la invención

- 5 La especies reactivas del oxígeno (ERO) son productos secundarios celulares formados por el metabolismo del oxígeno, son responsables de daños oxidativos celulares y pueden ser la causa de lesión celular, disfunción celular y muerte celular (apoptosis). Los efectos de las ERO en el metabolismo celular se han documentado bien. La acumulación de ERO en el tejido puede causar lesión oxidativa y por tanto puede ser deseable reducir las cantidades de ERO en los tejidos. Es deseable controlar la generación de ERO en células para determinar si las
- 10 ERO están implicadas en enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, inflamatorias e infecciosas. Normalmente las células pueden prevenir el daño oxidativo de ERO con enzimas, tales como superóxido dismutasa o catalasa. Otros compuestos también son útiles en la prevención de dicho daño, incluyendo antioxidantes tales como vitaminas, ácido úrico y glutatión. Dichos compuestos, (por ejemplo, antioxidantes), pueden desempeñar una función importante en la captación de radicales libres y en la protección de organismos hospedadores frente a
- 15 patógenos.

Aunque se han desarrollado muchos métodos para medir las cantidades de ERO en los tejidos, hay pocos métodos que midan las concentraciones de ERO intracelulares en tiempo real. La capacidad para medir cantidades de ERO es importante, ya que las concentraciones de ERO pueden cambiar, por ejemplo, aumentar o disminuir, a lo largo del tiempo.

- 20 Por consiguiente, existe un continuo interés en desarrollar y administrar composiciones antioxidantes eficaces para prevenir los daños por ERO. Sin embargo, hay pocos métodos que sean capaces de medir los efectos de las composiciones sobre la producción de ERO en tiempo real. Por lo tanto sería deseable desarrollar métodos que pudiesen medir los efectos de los componentes en la producción de ERO intracelular.

Breve resumen de la invención

- 25 De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona un método que puede utilizar medir las concentraciones de ERO intracelulares en tiempo real. El método de las realizaciones puede ser útil para determinar los efectos de los componentes de ensayo sobre la producción de ERO intracelular y el estrés oxidativo en una célula. Los métodos también pueden ser útiles para determinar la capacidad de los compuestos de ensayo para reducir los componentes de ERO en una célula, en la cual la ERO puede ser endógena o exógena para la célula.
- 30 Por tanto, determinadas realizaciones descritas en el presente documento incluyen un método para medir el efecto que tiene un componente de ensayo sobre la producción de ERO en una célula. El método incluye poner en contacto una célula con un material que sea capaz de emitir fluorescencia, poner en contacto la célula con un componente de ensayo, poner en contacto la célula con una ERO y con un estimulante de ERO y medir la fluorescencia celular. Adicionalmente las realizaciones incluyen medir la fluorescencia celular después de poner en contacto la
- 35 célula con el material capaz de emitir fluorescencia y bien con ERO o con un estimulante de ERO, medir la fluorescencia celular después de poner en contacto la célula con un componente de ensayo, comparar los dos valores de fluorescencia y determinar si el componente de ensayo reduce la ERO.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los valores de fluorescencia obtenidos en el Ejemplo 1; y

- 40 La FIG. 2 muestra los valores de fluorescencia de diversos componentes de ensayo, como se describe en el Ejemplo 1.

Descripción detallada de la invención

- 45 Como se usa a lo largo de esta descripción, los intervalos se usan como una abreviatura para describir cada uno y todos los valores que se encuentra en el intervalo. Puede seleccionarse cualquier valor dentro del intervalo como el extremo del intervalo. Además, todas las referencias citadas en este documento se incorporan en el mismo por referencia en su totalidad. En el caso de un conflicto en una definición y de una referencia citada en la presente divulgación, la presente divulgación lo controla.

- 50 A menos que se especifique de otra manera, debe entenderse que todos los porcentajes y las cantidades que se expresan en este documento y en cualquier parte de la memoria descriptiva se refieren a porcentajes en peso. Las cantidades proporcionadas están basadas en el peso del material activo.

A lo largo de esta descripción, el uso de artículos “el”, “la”, “un”, “uno”, “una” no pretenden limitar las realizaciones a una forma singular del artículo. Por ejemplo, la expresión “un componente” puede significar un solo componente o múltiples componentes. El componente en las realizaciones incluye compuestos químicos, péptidos pequeños y grandes y proteínas, ADN que expresa péptidos pequeños y grandes, proteínas y similares.

- 5 El método incluye poner en contacto una célula con un material capaz de emitir fluorescencia cuando se oxida o se reduce, poner en contacto una célula con un componente de ensayo, poner en contacto la célula con una ERO y con un estimulante de ERO, y medir la fluorescencia celular. Preferentemente, el material capaz de emitir fluorescencia es un colorante que, cuando se oxida, emite fluorescencia, más preferentemente un colorante seleccionado de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA), dihidrorodamina (DHR 123) y mezclas de las mismas. El método
10 también incluye el uso de un material que, cuando se reduce, es capaz de emitir fluorescencia.

Un método preferido incluye, como compuesto de ensayo, el uso de un antioxidante. Otro método preferido incluye, como ERO, un compuesto que genera iones de oxígeno, un compuesto que genera radicales libres, un peróxido o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la ERO es un peróxido y más preferentemente peróxido de hidrógeno. Otros métodos preferidos incluyen el uso de un estimulante de ERO, tal como un mediador inflamatorio.

- 15 El método de las realizaciones preferidas también incluye, como estimulante de ERO: (i) una endotoxina, exotoxina bacteriana, o combinaciones de las mismas; o (ii) un lipopolisacárido, lipooligosacárido o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la ERO es un lipopolisacárido.

- Una célula útil con diversos métodos de realizaciones preferidas incluye una célula inmunitaria, un linfocito, un linfoblasto, un macrófago, una célula nucleada, tal como una mitocondria, o mezclas de los mismos. La célula puede
20 ser una célula inmortalizada, o puede estar presente en un cultivo tisular. Preferentemente, la célula tiene una pared celular que es impermeable a un colorante. Además, el colorante puede acumularse en la mitocondria celular. Se prefiere eliminar con lavado cualquier exceso de colorante presente en la célula.

- En el método de las realizaciones preferidas, el compuesto de ensayo se transporta al interior de la célula, de manera activa o pasiva. Preferentemente, cualquier exceso de compuesto de ensayo se elimina de la célula
25 mediante lavado. Del mismo modo, preferentemente la ERO y el estimulante de ERO (por ejemplo, un mediador inflamatorio) se transporta hacia el interior de la célula, de manera activa o pasiva, y se prefiere eliminar con lavado cualquier exceso de ERO y de estimulante ERO presente en la célula.

- De acuerdo con diversos aspectos de realizaciones preferidas, inicialmente una célula se pone en contacto con un material capaz de emitir fluorescencia cuando se oxida o se reduce, preferentemente un colorante. Los colorantes
30 útiles en las realizaciones de la presente invención incluyen colorantes que emiten fluorescencia cuando se oxidan o se reducen. Preferentemente, dichos colorantes emiten fluorescencia cuando, por ejemplo, una ERO los oxida o reduce. Se prefiere el uso de colorantes que se ponen en contacto con células de una forma no fluorescente y después emiten fluorescencia cuando reaccionan con una ERO, por ejemplo, una ERO producida intracelularmente o introducida a partir de fuentes externas. Algunos colorantes útiles que poseen estos atributos son conocidos por
35 los expertos habituales en la técnica y pueden incluir colorantes del tipo de la fluoresceína, tales como diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). El DCF-DA es un colorante permeable a la membrana que puede difundirse a través de la membrana lipídica celular. No emite fluorescencia cuando está inactivo y forma una diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente cuando se oxida por ERO. Otros colorantes útiles en la presente invención pueden incluir derivados y análogos de fluorosceína, tales como dihidrorodamina (DHR 123), que es un análogo del DCF-DA. La DHR123 se acumula en la mitocondria, y por lo tanto puede ser particularmente útil en la determinación de
40 niveles de ERO en la misma. Otros colorantes útiles pueden incluir derivados de fluorosceína, tales como el Verde Oregón, Verde Tokio, carboxi-seminaftofluoresceína (SNAFL - disponible en Molecular Probes, (Invitrogen Corp.), Carlsbad, CA), carboxi-naftofluoresceína, colorantes Alexa Fluor (por ejemplo, Alexa 488 - también disponible en Molecular Probes, (Invitrogen Corp.), Carlsbad, CA), colorantes DyLight Fluor (por ejemplo DyLight 488, disponible
45 en el comercio de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y colorantes HiLyte Fluor (disponibles en el comercio de AnaSpec, San José, CA). Las células pueden incubarse con el colorante para permitir la incorporación del colorante en la célula. Después de esto, las células pueden lavarse para eliminar el colorante residual.

- Después de marcar con un colorante, la célula puede exponerse a uno o más compuestos de ensayo. Dichos compuestos de ensayo se introducen preferentemente en la célula mediante transporte activo o pasivo, por ejemplo,
50 difusión, y preferentemente se quedan dentro de la célula. Las células pueden incubarse en presencia de dichos compuestos de ensayo y después lavarse para eliminar los compuestos de ensayos residuales.

- Después del tratamiento con el compuesto de ensayo, la célula se expone preferentemente a ERO. ERO incluye típicamente iones de oxígeno, radiales libres y peróxidos, tanto orgánicos como inorgánicos y compuestos que generan dichos iones de oxígeno y radicales libres intracelularmente. Las ERO (o agentes ERO) son conocidas por
55 los expertos en la técnica y generalmente son moléculas pequeñas que son muy reactivas debido a la presencia de electrones de corteza de valencia desapareados. Como ejemplos de peróxidos se incluyen hidroperóxidos, peróxido de hidrógeno, peróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, compuestos de peróxido orgánico, peroxiácidos y

mezclas de los mismos. La célula puede exponerse a los agentes ERO a partir de una fuente externa, en la cual la célula puede incubarse en medios que contengan el agente ERO que permita a la célula incorporar el agente ERO intracelularmente, por ejemplo, mediante transporte activo o pasivo. Después las células pueden lavarse para eliminar la ERO residual que no se ha incorporado en la célula.

5 En una realización de la presente invención, la ERO puede ponerse en contacto con una célula junto con un compuesto que induce la producción de ERO, por ejemplo, un estimulante de ERO, tal como un mediador inflamatorio en el cual el mediador causa o se sabe que causa la producción de ERO en una célula. En otra realización adicional la célula se pone en contacto con el estimulante de ERO en ausencia del agente ERO adicional. Como se sabe en la técnica, el mediador inflamatorio puede incluir una toxina bacteriana, por ejemplo, una
10 endotoxina o exotoxina, tal como un lipopolisacárido o lipooligosacárido. La célula puede incubarse con la ERO y el mediador inflamatorio de manera que se permite que la ERO y el mediador inflamatorio se incorporen en la célula. Después, la célula puede lavarse para eliminar la ERO y el mediador inflamatorio residual. Como alternativa, la célula puede incubarse con el mediador inflamatorio para permitir que el mediador inflamatorio se incorpore en la célula. Después, la célula puede lavarse para eliminar el mediador inflamatorio residual.

15 Los métodos de las realizaciones descritas en el presente documento contemplan medir la fluorescencia de las células que se han puesto en contacto con los diversos componentes. Los métodos incluyen medir la fluorescencia después de poner en contacto las células con el material capaz de emitir fluorescencia y con la ERO y el estimulante de ERO y después medir la emisión de fluorescencia tras poner en contacto las células con estos componentes y con el compuesto de ensayo. La emisión de fluorescencia puede determinarse mediante cualquier método conocido
20 por los expertos habituales en la técnica y que se encuentran fácilmente disponibles. Dichos métodos conocidos y disponibles en el comercio incluyen tecnología de matriz óptica de células vivas o sistemas de formación de imágenes al microscopio. Como es bien sabido, la emisión de fluorescencia típicamente se mide por excitación y emisión. Los expertos habituales en la técnica pueden medir y determinar la emisión de fluorescencia usando las directrices proporcionadas en el presente documento.

25 Sin pretender quedar limitado a ninguna teoría, se piensa que los métodos de la presente invención permiten analizar en tiempo real los efectos de los compuestos de ensayo sobre los niveles de ERO intracelulares. Incorporando en las células un componente capaz de emitir fluorescencia, un compuesto de ensayo, y después una ERO/mediador inflamatorio, se puede medir la actividad antioxidante del compuesto de ensayo midiendo la fluorescencia celular. El componente capaz de emitir fluorescencia después de la oxidación o de la reducción,
30 preferentemente un colorante, tiene típicamente alguna fluorescencia de fondo, pero después de la unión a los radicales libres, la intensidad de la fluorescencia aumenta. Este aumento de la intensidad de fluorescencia puede medirse fácilmente. Los compuestos de ensayo pueden añadirse a las células para evaluar su capacidad para reducir la formación de radicales libres por ERO (o su consumo por reacción) y si son capaces de reducir la formación de radicales libres, la intensidad de fluorescencia debería disminuir.

35 Por consiguiente, un compuesto de ensayo que tenga una mayor capacidad de inhibir ERO da como resultado una reacción en la que una menor cantidad de ERO puede reaccionar con el colorante y por tanto hay una fluorescencia reducida. Por otro lado, un compuesto de ensayo que no inhibe ERO da como resultado una reacción en la que una mayor cantidad de ERO puede reaccionar con el colorante y por tanto hay una fluorescencia aumentada. La fluorescencia celular puede monitorizarse durante un periodo de tiempo de minutos, horas o días para determinar el
40 efecto del compuesto de ensayo sobre ERO/mediador inflamatorio.

En una realización, la célula se pone en contacto con un colorante antes de ponerse en contacto con un compuesto de ensayo. Opcionalmente, la célula se pone en contacto con un compuesto de ensayo antes de ponerse en contacto con una ERO y un estimulante de ERO. En otra realización, la ERO se introduce en la célula, por ejemplo, la ERO es exógena a la célula.

45 Las células útiles en los métodos preferidos incluyen células nucleadas que tienen mitocondrias. Las células pueden ser células inmortalizadas, por ejemplo, células cancerosas y pueden ser células inmunitarias, tales como un linfocito o células linfoblásticas. Dichas células pueden cultivarse en diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las células también pueden cultivarse *in situ* durante un procedimiento operativo o de reconocimiento, y después ensayarse en tiempo real para evaluar los efectos de determinados compuestos de ensayo sobre la
50 inhibición de la producción de ERO celular.

Los métodos de las realizaciones son útiles en la determinación de los efectos de los compuestos que tienen sobre la producción de ERO en las células. Como se ha indicado anteriormente, se sabe que la generación de radicales libres en una célula no es deseable, dando a menudo como resultado la muerte celular. Por ejemplo, determinadas bacterias tienen el efecto de inducir la formación de radicales libres en células humanas y por consiguiente dañar las
55 células. Los métodos descritos en el presente documento pueden determinar compuestos de ensayo que pueden reducir la formación de radicales libres (dando como resultado una intensidad de fluorescencia más baja), y por tanto pueden ser útiles para contrarrestar los efectos perjudiciales de las bacterias.

Muchas bacterias de este tipo se encuentran en la cavidad y mucosa bucal. Las bacterias pueden causar diversos efectos perjudiciales. Por ejemplo, las células bacterianas pueden usarse como las células de las realizaciones preferidas, preferentemente, células anaerobias facultativas. El método puede después medir la capacidad de determinados compuestos de ensayo para reducir la generación de radicales libres de dichas células.

5 Por tanto, los métodos de las realizaciones pueden usarse *in situ* para determinar una terapia eficaz (administración de un compuesto de ensayo eficaz que reduzca adecuadamente la fluorescencia) para el tratamiento de determinadas células susceptibles a la generación de radicales libres. Los métodos de las realizaciones también son
10 útiles para demostrar la eficacia de determinados compuestos (o composiciones que contienen estos compuestos) en células conocidas, por ejemplo, células bacterianas. Por ejemplo, el método puede usarse para mostrar a un odontólogo cuan eficaz es un determinado científico para reducir la generación de radicales libres en células bacterianas normalmente encontradas en la boca humana. El método también puede usarse como una herramienta comparativa en la comercialización de un producto mostrando comparaciones entre productos (por ejemplo, dentífricos de diversas empresas de la competencia).

15 Las realizaciones preferidas de la invención se describirán ahora con respecto al siguiente ejemplo no limitante. El ejemplo es únicamente ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance de la invención que se describe y reivindica.

EJEMPLO 1

20 Inicialmente se cultivaron células U937 de linfoma histocítico humano (ATCC, Manassas, VA) en medio RPMI-1640 (ATCC, Manassas, VA) que contenía suero al 10 % y penicilina al 1 % y después se transfirieron a una concentración de 2×10^5 células/ml en medio que contenía PMA 1 ng/ml durante 48 horas a 37 °C. Las células se privaron durante una noche en medio de cultivo asérico antes de exponerse al colorante.

Las células se lavaron dos veces con tampón PBS y se dividieron en dos grupos para incubarse con DCF-DA o DHR123 (Calibiochem, La Jolla, CA) durante 30 minutos a 30 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el colorante residual. También se mantuvieron controles experimentales apropiados.

25 Después las células se dividieron en varios grupos y a cada uno de los grupos se añadieron diversas cantidades de una solución de α -tocoferol (Vitamina E) al 1 %, sustancia 1, o sustancia 2 y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar las cantidades residuales de los compuestos de ensayo. Después se añadieron agentes ERO, H_2O_2 y LPS, y se incubaron durante periodos de tiempo diferentes. Después se leyó la emisión de fluorescencia de las células a una excitación de 485 nm y a una emisión de 530 nm durante hasta 5 horas.

30 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, las células teñidas solamente con colorante, por ejemplo, DCF-DA y DHR123 mostraron fluorescencia de fondo. En lo que respecta a la Figura 1, después de dos horas de incubación, las células incubadas en ausencia de un compuesto de ensayo pero en presencia de ERO a 2,5 mM y estimulante de ERO emitían más fluorescencia que las células incubadas en presencia de un compuesto de ensayo (α -tocoferol) y ERO a 2,5 mM y estimulante de ERO.

35 Por lo tanto, el análisis de la emisión de fluorescencia de las células permite monitorizar en tiempo real el estrés oxidativo intracelular que puede usarse para explorar compuestos de ensayo. La medición de la emisión de fluorescencia de las células puede realizarse con tecnología de matriz óptica de células vivas y/o sistemas de formación de imágenes al microscopio en células individuales.

40 En referencia a la Figura 2, con las células se incubaron 2 ppm, 10 ppm o 100 ppm de α -tocoferol, sustancia 1 y sustancia 2. La Figura 2 revela que en presencia de 2,5 mM de peróxido de hidrógeno, 2 ppm de α -tocoferol y sustancia 1 reaccionan con ERO y reducen el nivel oxidativo aproximadamente al 30 %. A 10 ppm y a 100 ppm, el α -tocoferol no mostró capacidad potenciada en la captación de ERO o de radicales libres; sin embargo, 10 ppm de sustancia 1 redujo el nivel oxidativo al 50 %. La Figura 2 también revela que la sustancia sustrato 2 potenció el nivel oxidativo y que la sustancia 2 aumentó a casi 3 veces el nivel de radicales libres a 100 ppm, cuando se comparó con
45 2 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la eficacia de un componente de ensayo en la reducción de componentes de especies reactivas del oxígeno (ERO) en una célula que comprende:
 - a. poner en contacto una célula con un material capaz de emitir fluorescencia;
 - 5 b. poner en contacto la célula con el componente de ensayo;
 - c. poner en contacto la célula con una ERO y con un estimulante de ERO, en el que la ERO se selecciona del grupo que consiste en un compuesto que genera un ion de oxígeno, un compuesto que genera un radical libre, un peróxido, y mezclas de los mismos y caracterizado porque el estimulante de ERO se selecciona del grupo que consiste en una endotoxina, exotoxina bacteriana y mezclas de las mismas, o que comprende un lipopolisacárido; y
 - 10 d. medir la fluorescencia celular.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el material capaz de emitir fluorescencia es un colorante que emite fluorescencia cuando se oxida, en el que opcionalmente el colorante se selecciona del grupo que consiste en diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA), dihidrorodamina (DHR 123) y mezclas de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1 en el que el material capaz de emitir fluorescencia es un colorante que cuando se reduce emite fluorescencia.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que el componente de ensayo es un antioxidante.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la ERO es un peróxido, opcionalmente peróxido de hidrógeno.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula inmunitaria
7. El método de la reivindicación 1, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito, un linfoblasto, un macrófago, una bacteria, un anaerobio facultativo y mezclas de los mismos.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, en el que la célula tiene una pared que es permeable al material capaz de emitir fluorescencia.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el componente de ensayo se transporta al interior de la célula.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el componente de ensayo se transporta de manera activa o pasiva al interior de la célula.
- 25 11. El método de la reivindicación 1, en el que la ERO se transporta al interior de la célula mediante transporte activo o pasivo.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la célula emite fluorescencia.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el método mide el contenido de ERO de la célula.
- 30 14. Un método para medir la eficacia de un componente de ensayo en la reducción de componentes de ERO en una célula que comprende:
 - a. poner en contacto una célula con un material capaz de emitir fluorescencia;
 - b. poner en contacto la célula con un componente de ensayo;
 - c. medir la fluorescencia de celular;
 - 35 d. poner en contacto la célula con una ERO y un estimulante de ERO, en el que la ERO se selecciona del grupo que consiste en un compuesto que genera iones de oxígeno, un compuesto que genera radicales libres, un peróxido y mezclas de los mismos y en el que el estimulante de ERO se selecciona del grupo que consiste en una endotoxina, exotoxina bacteriana y mezclas de las mismas, o que comprende un lipopolisacárido;
 - e. medir la fluorescencia celular; y

f. comparar la fluorescencia celular de c con la fluorescencia de e y determinar la eficacia del componente de ensayo en la reducción de ERO.

FIGURA 1

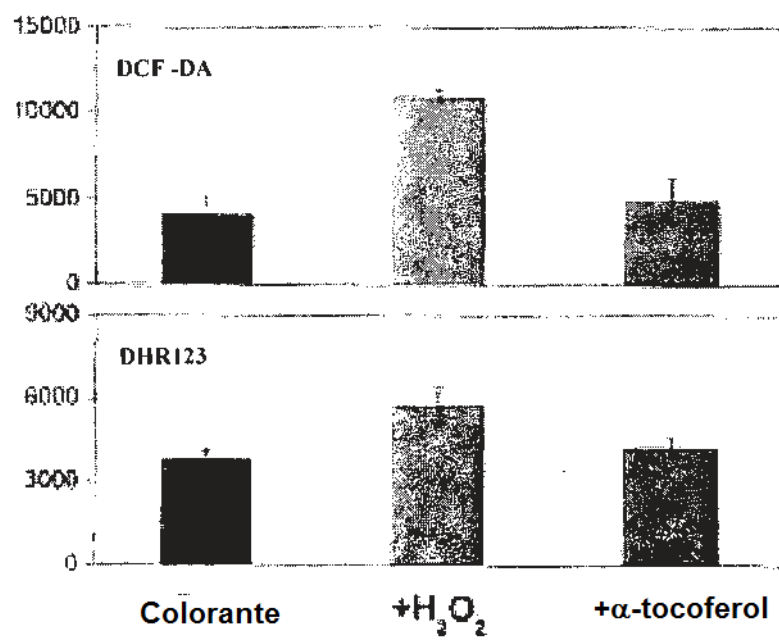


FIGURA 2

