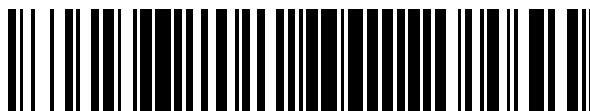


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 997**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2006 E 06751197 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1885353**

54 Título: **Uso de tocotrienoles de vitamina E para la inhibición del patógeno intracelular obligado Chlamydia**

30 Prioridad:

22.04.2005 US 673837 P

01.03.2006 US 778432 P

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

06.04.2015

73 Titular/es:

STUART, ELIZABETH (33.3%)

38 Chapel Road

Amherst, MA 01002 , US;

MUELLER, ANNE (33.3%) y

TAN, BARRIE (33.3%)

72 Inventor/es:

STUART, ELIZABETH;

MUELLER, ANNE y

TAN, BARRIE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 532 997 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

Uso de tocotrienoles de vitamina E para la inhibición del patógeno intracelular obligado *Chlamydia*

Otras referencias

- 5 Azenabor AA, *et al.*: "*Chlamydia pneumoniae* infected macrophages exhibit enhanced plasma membrane fluidity and show increased adherence to endothelial cells". Mol. Cell. Biochem. 2005, 269 (1-2): 69-84.
- Byrne GI, *et al.*: "*Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen". Nat. Rev. Microbiol. 2004, 2: 802-8.
- Carabeo RA, *et al.*: "Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100 (11): 6771-6.
- 10 English J: "Do your antioxidants suppress enough free radicals?" Life Extension febrero de 2005; 22-31.
- English J: "Novel dietary supplement shows dramatic effects in lowering cholesterol, LDL, and triglycerides". Life Extension noviembre de 2005: 28-38.
- Gabel BR, *et al.*: "Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cell". Infection and Immunity 2004, 72 (12): 7367-7373.
- 15 Granato H: "Cardiovascular Health". Natural Products Industry Insider 3 de enero de 2005: 24-40.
- Granato H: "Cardiovascular Wellness". Natural Products Industry Insider 6 de enero de 2005: 20-35.
- Grayston JT, *et al.*: "A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR". J. Infect. Dis. 1990, 161 (4): 618-25.
- 20 Kooyenga, *et al.*: "Antioxidants modulate the course of carotid atherosclerosis: A four-year study". "Micronutrient & Health: Molecular Biological Mechanisms". Nesaretnam K, Packer L (Eds.). AOCS Press: Illinois, 2001. pág. 366-375.
- Ling Z, Bunday R A: "Statin treatment of human vascular endothelial cells disrupts caveolae and increases nitric oxide signaling". FASEB J. 2006, 20: 787.3.
- 25 Mo HB, Elson CE: "Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention". Exp. Bio. Med. 2004, 229: 567-585.
- Myers S: "How to avoid a broken heart: using nutrients to control the leading risk factors of heart disease". Insider 9 de enero de 2006: 22-30.
- Naguib Y: "Natural alternatives for maintaining healthy cholesterol". Vitamin Retailer octubre de 2004: 58-61.
- 30 Parker RA, *et al.*: "Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase". J. Biol. Chem. 1993, 268: 11230-8.
- Pearce BC, *et al.*: "Hypocholesterolemic Activity of Synthetic and Natural Tocotrienols". J. Med. Chem. 1992, 35: 3595-06.
- Sawayama Y, *et al.*: "Association of *Chlamydia pneumoniae* antibody with the cholesterol-lowering effect of statins". Atherosclerosis 2003, 171: 281-285.
- 35 Srejjic E: "Keeping the ticker in tip-top shape". HSR Health Supplement Retailer marzo de 2006: 20-28.
- Strum S, Faloon W: "Beta-Sitosterol and the aging prostate gland". Life Extension junio de 2005: 27-31.

Stuart ES, *et al.*: "Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells". Exp. Cell. Res. 2003, 1: 67-78.

Tan B.: "Appropriate Spectrum Vitamin E and New Perspectives on Desmethyl Tocopherols and Tocotrienols". JANA 2005, 8(1): 35-42.

- 5 Yamazaki T, *et al.*: "Biosynthesized tea polyphenols inactivate *Chlamydia trachomatis* in vitro". Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49 (6): 2501-2503.

Yamazaki T, *et al.*: "The inhibitory effect of antihyperlipidemic drugs on the growth of *Chlamydia pneumoniae* in vitro". J. Chemother. 2006, 18 (1): 107-9.

Campo de la invención

- 10 La invención es sobre el uso de tocotrienol para inhibir, prevenir y desestabilizar el ciclo celular de desarrollo e infección de *Chlamydia*, y a su uso para aliviar los efectos de enfermedades relacionadas con *Chlamydia*.

Antecedentes de la invención

- 15 *Chlamydia* es un patógeno intracelular obligado conocido por estar asociado a varias enfermedades que son comunes hoy en día. *Chlamydia trachomatis* es la causa principal de enfermedad de transmisión sexual (ETS) bacteriana y puede conducir a embarazos ectópicos e infertilidad. *Chlamydia pneumoniae* causa infecciones del tracto respiratorio, incluyendo bronquitis, neumonía, sinusitis y faringitis. Además, está ligada a numerosas patologías, incluyendo enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria y asma. Son tres descubrimientos recientes de *Chlamydia*: 1) diversas cepas de especies de *Chlamydia* clínicamente importantes están asociadas a caveolina, una molécula importante para la homeostasis del colesterol, 2) la apoptosis (muerte celular programada) está regulada negativamente entre las células infectadas (Byrne *et al.*, 2004) y 3) el tratamiento de infecciones por *Chlamydia* con antibióticos lleva a los patógenos a un estado resistente y persistente. La persistencia clínica es un elemento esencial de la patogénesis por *Chlamydia*, en el que la incapacidad del hospedador de eliminar el patógeno conduce a un estado de infectividad crónica junto con la lesión de tejido acompañante.

- 25 El tocotrienol δ es un compuesto de vitamina E también disponible como suplemento dietético. Se ha mostrado que reduce el colesterol de forma controlada y que induce la apoptosis en células cancerosas, reduciendo los tumores hasta un 70 %. Puesto que la especie *Chlamydia* entra en las células a través de dominios de balsas lipídicas ricas en colesterol implicadas en el tránsito de colesterol, los tocotrienoles en general y el tocotrienol δ hipocolesterolémico en particular reducirán la infección por *Chlamydia*. Se incubaron macrófagos de ratón (J774A.1), células de tumor mamario humano (MCF-7, TMX2-28), células epiteliales humanas (Hep-2) y linfocitos B humanos (JY) con tocotrienol δ a concentraciones de 10-30 $\mu\text{mol/l}$ durante 6 horas antes de la infección por *C. trachomatis* serovar K, una subespecie de *Chlamydia* que es la causa principal de ETS iniciada por bacteria. Las infecciones se detectaron por tinción de inmunofluorescencia seguida de microscopia o análisis citométrico de flujo cuantitativo. Los niveles de infección en células pretratadas con tocotrienol δ se redujeron en > 50 %, con desarrollo patogénico aberrante concomitante observado con microscopia confocal. El número de inclusiones grandes y pequeñas en las células con tocotrienol δ frente a control disminuyó 3 y 2 veces, respectivamente. La citometría de flujo mostró que la inhibición de *Chlamydia* en células JY era al menos doble durante un periodo de infección de 72 horas, con una inhibición máxima de 2,6 veces a las 36 horas. Se está examinando el impacto del tocotrienol δ dietético sobre la infección por *Chlamydia* en pacientes hiperlipidémicos en un estudio clínico. El tocotrienol δ supresor del colesterol puede tener el potencial de reducir la infección por *Chlamydia* en seres humanos.

- 45 *Chlamydia* es un patógeno intracelular obligado, lo que significa que tiene que invadir células en primer lugar para sobrevivir exitosamente dentro del hospedador. Esta infección se inicia por los denominados cuerpos elementales (CE) de *Chlamydia*. Una vez dentro de las células hospedadoras, ocurre la replicación de *Chlamydia* en un compartimento unido a membrana segregado llamado inclusión, que se agranda progresivamente debido a la replicación metabólicamente activa de *Chlamydia* en la célula hospedadora.

- 50 Son especies del género *Chlamydiaceae* que están asociadas frecuentemente a enfermedades humanas crónicas *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis*. *C. pneumoniae* causa un 5-10 % de las infecciones del tracto respiratorio en adultos y niños, incluyendo bronquitis, neumonía, sinusitis y faringitis. Adicionalmente, se ha ligado a enfermedades crónicas como enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, esclerosis múltiple, artritis reactiva, aterosclerosis y asma. Se ha sugerido que la infección por *C. pneumoniae* induce autoinmunidad. En la esclerosis múltiple (EM), se ha mostrado que un 73 % de los pacientes eran positivos de *Chlamydia*, en comparación con un 22 % de los controles. Además, *C. pneumoniae* está implicada en procesos ateroscleróticos tales como la oxidación celular de LDL y la formación de células de espuma de macrófagos. A la edad de 20 años, el 50 % de la población

5 exhibe evidencias de infección pasada por *C. pneumoniae* (mostrado por pruebas serológicas) y la reinfección es común. Adicionalmente, en un estudio que examina en una población donante de sangre normal los niveles de infección por *Chlamydia*, se encontró que un 25 % de la población era positiva por frotis de sangre con inmunotinción. Por lo tanto, es posible que las pruebas serológicas (p.ej. ELISA) sobreestimen la inmunotinción de las pruebas sanguíneas (p.ej. los leucocitos reales) en ≥ 2 veces. *C. trachomatis*, por otro lado, es la causa principal mundial de ceguera infecciosa prevenible, y la causa más común de ETS. En mujeres, la infección por *C. trachomatis* afecta inicialmente a las membranas mucosas y conduce a una inflamación continua del tejido del tracto genital, lo que da como resultado cicatrización y eventual infertilidad. Después de la invasión de las células, *Chlamydia* agrega en estructuras de tipo vacuola llamadas inclusiones, y puede escapar a muchas de las defensas de primera línea del sistema inmunitario del hospedador. Es otro rasgo de *Chlamydia* que previene la apoptosis de células infectadas (Byrne, *et al.*, 2004). Este efecto es protector para el patógeno, porque puede completar un ciclo replicativo en la célula individual del hospedador (Figura 1). Puesto que las inclusiones de *Chlamydia* dentro de una célula individual infectada del hospedador requieren incubación para dar lugar a 200-1.000 unidades infecciosas nuevas, la inhibición de la apoptosis de células hospedadoras por *Chlamydia* es ventajosa para el patógeno y apoya el establecimiento de una infección prolongada. Por lo tanto, es un aspecto de la invención que los tocotrienoles inhibirán el crecimiento de *Chlamydia* dentro de las células hospedadoras, causando que el hospedador infectado experimente apoptosis. Es otro aspecto de la invención que los tocotrienoles prevendrán la progresión del ciclo celular incubativo del patógeno.

20 El tocotrienol δ es un compuesto de la vitamina E. Los estudios de cáncer con este compuesto han mostrado que induce la apoptosis de células tumorales, pero no daña las células sanas circundantes. Descubrir que el tocotrienol δ tiene esta capacidad, al menos para células cancerosas, originó la idea de que el compuesto pueda regular positivamente también la apoptosis de células infectadas por *Chlamydia*. Puesto que la inhibición por *Chlamydia* de la apoptosis de células hospedadoras es importante para el éxito del patógeno, dicho efecto del tocotrienol δ podría tener un profundo impacto como tratamiento contra *Chlamydia*. Otra característica importante del tocotrienol δ es su efecto reductor del colesterol (Pearce *et al.*, 1992). *Chlamydia* entra en la célula hospedadora a través de balsas lipídicas o caveolas ricas en colesterol, que comprenden conjuntos laterales de colesterol y esfingolípidos que flotan en la membrana glicerosfolipídica, y se afectan por la retirada del colesterol de la membrana plasmática. Por lo tanto, las células que están expuestas a tocotrienol δ podrían remodelar las balsas lipídicas y por tanto interferir con la entrada de patógeno en las células hospedadoras directa o indirectamente. Puesto que *Chlamydia* es metabólicamente inactiva fuera del hospedador, es incapaz de sobrevivir fuera de la célula. Es una estrategia potencial inhibir la síntesis o disponibilidad de colesterol para contener o eliminar *Chlamydia*.

En esta invención, se ensayó el efecto del tocotrienol δ sobre la infección por *Chlamydia* en numerosos leucocitos normales, células cancerosas y capas leucocíticas de muestras de sangre humana positivas de *Chlamydia*.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a los siguientes puntos:

1. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra durante al menos 3 días a una dosis de entre 10 y 1.000 mg al día a un mamífero necesitado de tratamiento.
- 40 2. Uso de un uso de un tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho medicamento se administra durante al menos 3 días a una dosis de entre 10 y 1.000 mg al día un mamífero necesitado de tratamiento.
3. El tocotrienol del punto 1 o el uso del punto 2, en el que el tratamiento inhibe, previene o desestabiliza el desarrollo del ciclo celular e infección de *Chlamydia*.
- 45 4. El tocotrienol del punto 1 o 3 o el uso del punto 2 o 3, en el que el tratamiento comprende adicionalmente administrar un geranilgeraniol.
5. El tocotrienol de uno cualquiera de los puntos 1 o 3 a 4 o el uso de uno cualquiera de los puntos 2 a 4, en el que dicho tocotrienol se selecciona del grupo consistente en un tocotrienol natural y un tocotrienol sintético.
7. El tocotrienol o el uso del punto 5, en el que dicho tocotrienol se selecciona del grupo consistente en tocotrienol α , tocotrienol β , tocotrienol γ , tocotrienol δ , desmetiltocotrienol y didesmetiltocotrienol.
- 50 8. El tocotrienol o el uso del punto 7, en el que el tocotrienol es tocotrienol δ .
9. El tocotrienol de uno cualquiera de los puntos 1 o 3 a 8 o el uso de uno cualquiera de los puntos 2 a 8, en el que *Chlamydia* se selecciona del grupo consistente en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia abortis*, *Chlamydia felis* y *Chlamydia caviae*.

10. El tocotrienol de uno cualquiera de los puntos 1 o 3 a 9 o el uso de uno cualquiera de los puntos 2 a 9, en el que el tocotrienol impide el crecimiento e inhibe la maduración en *Chlamydia* de cuerpos reticulados hasta cuerpos elementales, previniendo su progresión y desarrollo.
- 5 11. El tocotrienol de uno cualquiera de los puntos 1 o 3 a 10 o el uso de uno cualquiera de los puntos 2 a 10, en el que el tocotrienol reduce la infección por *Chlamydia* de un leucocito.
12. El tocotrienol o el uso del punto 11, en el que el leucocito se selecciona del grupo consistente en neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.
- 10 13. El tocotrienol de uno cualquiera de los puntos 1 o 3 a 12 o el uso de uno cualquiera de los puntos 2 a 12, en el que el modo de aplicación del tocotrienol se selecciona del grupo consistente en pulverizador en aerosol, ingestión oral, cremas, duchas, lociones y gotas oculares.
14. El tocotrienol o el uso del punto 13, que comprende administrar una dosis de tocotrienol de entre 20 y 500 mg al día, o entre 50 y 150 mg al día.
- 15 15. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω3, una lecitina, ajo, guggulípidos, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura rojo y un mineral.
- 20 16. Uso de tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω3, una lecitina, ajo, guggulípidos, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura rojo y un mineral.
- 25 17. El tocotrienol del punto 15 o el uso del punto 16, en el que el agente es un bioflavonoide cítrico.
- 30 18. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que el tocotrienol se administra durante al menos 3 días a un mamífero o ave, en el que dicho mamífero o ave padece una enfermedad asociada a *Chlamydia* seleccionada del grupo consistente en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual, infección del tracto genital, artritis, prediabetes, síndrome metabólico, diabetes, síndrome del ovario poliquístico (SOP), infección del tracto respiratorio, neumonía, infección ocular, enfermedad neurológica, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- 35 19. Uso de tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que el tocotrienol se administra durante al menos 3 días a un mamífero o ave, en el que dicho mamífero o ave padece una enfermedad asociada a *Chlamydia* seleccionada del grupo consistente en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual, infección del tracto genital, artritis, prediabetes, síndrome metabólico, diabetes, síndrome del ovario poliquístico (SOP), infección del tracto respiratorio, neumonía, infección ocular, enfermedad neurológica, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- 40 20. Un tocotrienol para uso en la mejora de la inmunidad ante *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol potencia una célula dendrítica presentadora de antígeno.
21. Uso de tocotrienol para la fabricación de un medicamento para mejorar la inmunidad ante *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol potencia una célula dendrítica presentadora de antígeno.

Además, se dan a conocer usos de vitamina E para inhibir y prevenir la infección por *Chlamydia*. Adicionalmente, se da a conocer el mecanismo de acción de la vitamina E, especialmente tocotrienol δ, para interrumpir el proceso infeccioso de una *Chlamydia*.

- 45 Se da a conocer un procedimiento de uso de la vitamina E tococromanol para inhibir, prevenir y desestabilizar el ciclo celular de desarrollo e infección por *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir, prevenir y desestabilizar el ciclo celular de desarrollo e infección de *Chlamydia*. Se da a conocer también un procedimiento de uso de tocotrienol δ para inhibir, prevenir y desestabilizar el desarrollo del ciclo celular e infección de *Chlamydia*.
- 50 Se da a conocer también un procedimiento de uso de la vitamina E tococromanol para aliviar los efectos de enfermedades relacionadas con *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para aliviar los efectos de enfermedades relacionadas con *Chlamydia*. Se da a conocer también un procedimiento de uso de tocotrienol δ para aliviar los efectos de enfermedades relacionadas con *Chlamydia*.

Se da a conocer también un procedimiento de uso de la vitamina E tococromanol para reducir la cantidad de inclusiones de *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir la cantidad de inclusiones de *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ para reducir la cantidad de inclusiones de *Chlamydia*.

5 Se da a conocer un procedimiento de uso de la vitamina E tococromanol para impedir y suprimir la infección inicial por CE de *Chlamydia* de las células hospedadoras. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para impedir y suprimir la infección inicial por CE de *Chlamydia* de células hospedadoras. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ para impedir y suprimir la infección inicial por CE de *Chlamydia* de células hospedadoras.

10 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ 5 $\mu\text{mol/l}$ para inhibir el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ 10 $\mu\text{mol/l}$ para inhibir el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ 20 $\mu\text{mol/l}$ para inhibir el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ 30 $\mu\text{mol/l}$ para inhibir el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ 40 $\mu\text{mol/l}$ para inhibir el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora.

15 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ varias veces para reducir el nivel de infección por *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ de 3 a 10 veces para reducir el nivel de infección por *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ más de 10 veces para reducir el nivel de infección por *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ repetidamente para reducir el nivel de infección por *Chlamydia*.

20 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ varias veces para inhibir la reinfección de la célula hospedadora por CE de *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ de 3 a 10 veces para inhibir la reinfección de la célula hospedadora por CE de *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ más de 10 veces para inhibir la reinfección de la célula hospedadora por CE de *Chlamydia*. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol δ repetidamente para inhibir la reinfección de la célula hospedadora por CE de *Chlamydia*.

25 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 5 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 10 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 15 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 20 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 25 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 30 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 40 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 45 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 50 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 60 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 75 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para inhibir la formación de inclusiones un 90 %.

30 Se da a conocer un procedimiento de uso de la vitamina E tococromanol. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol durante al menos un día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol durante al menos 3 días. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol durante más de 3 días.

35 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol eficaz en seres humanos frente a *Chlamydia*, como se representa por los leucocitos en circulación, incluyendo neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.

40 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir el nivel de colesterol e infección por *Chlamydia* en pacientes hiperlipidémicos, y volver negativo el estado de infección por *Chlamydia*.

45 Se da a conocer un procedimiento de uso de un agente que restringe el colesterol/lípidos para restringir la infección y crecimiento de *Chlamydia*.

Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir las infecciones por *Chlamydia* en pacientes de cáncer.

50 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para contrarrestar las infecciones patogénicas, incluyendo *Chlamydia*, mediante la activación de células dendríticas presentadoras de antígeno y linfocitos T.

Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para resistir la infección oportunista por *Chlamydia* de pacientes hipertensos, y reducir así la presión sanguínea del paciente.

Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir factores de riesgo cardiovascular asociados al síndrome metabólico, y reducir así el riesgo de diabetes e infección concomitante o posterior por *Chlamydia*.

- 5 Se da a conocer un procedimiento de aplicación de tocotrienol mediante pulverizadores en aerosol (para alcanzar las vías aéreas del tracto respiratorio), ingestión oral por cápsulas blandas, comprimidos o cápsulas (para alcanzar los sistemas vascular-orgánicos), cremas, duchas y lociones tópicas (para alcanzar los sitios genitales) y gotas líquidas tópicas (para alcanzar los sitios oculares).

- 10 Se da a conocer un procedimiento de aplicación de tocotrienol mediante ingestión oral por cápsulas blandas, comprimidos o cápsulas y cremas, duchas y lociones tópicas. Se da a conocer un procedimiento de aplicación de tocotrienol mediante ingestión oral por cápsulas blandas, comprimidos o cápsulas. Se da a conocer un procedimiento de administración de tocotrienol δ en un intervalo de 10 a 1000 mg al día. Se da a conocer un procedimiento de administración de tocotrienol δ en un intervalo de 20 a 500 mg al día. Se da a conocer un procedimiento de administración de tocotrienol δ en un intervalo de 50 a 150 mg al día. Se da a conocer un procedimiento de tratamiento con tocotrienol δ por administración diaria durante un mes. Se da a conocer un procedimiento de tratamiento con tocotrienol δ por administración diaria durante seis meses. Se da a conocer un procedimiento de tratamiento con tocotrienol δ por administración diaria durante un año. Se da a conocer un procedimiento de tratamiento con tocotrienol δ por administración diaria hasta que se resuelven la infección e inflamación debidas a *Chlamydia*.

- 20 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto respiratorio usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 1 pulverización al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto respiratorio usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 2 pulverizaciones al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto respiratorio usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 4 pulverizaciones al día.

- 25 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto genital usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 1 aplicación al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto genital usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 2 aplicaciones al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para infecciones del tracto genital usando un pulverizador en aerosol a una dosificación de 4 aplicaciones al día.

- 30 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir la inflamación de sistemas vascular-orgánicos debida a infección por *Chlamydia* mediante ingestión oral de 1 dosis al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir la inflamación de sistemas vascular-orgánicos debida a infección por *Chlamydia* mediante ingestión oral de 2 dosis al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir la inflamación de sistemas vascular-orgánicos debida a infección por *Chlamydia* mediante ingestión oral de 4 dosis al día.

- 35 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir infecciones oculares y conjuntivitis debidas a infección por *Chlamydia* mediante la aplicación de gotas oculares líquidas con 1 aplicación al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir infecciones oculares y conjuntivitis debidas a infección por *Chlamydia* mediante la aplicación de gotas oculares líquidas con 2 aplicaciones al día. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol para reducir infecciones oculares y conjuntivitis debidas a infección por *Chlamydia* mediante la aplicación de gotas oculares líquidas con 4 aplicaciones al día.

- 40 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:100 a 100:1. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:25 a 25:1. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:10 a 10:1. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:5 a 5:1. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:1.

- 45 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende una mezcla de extracto de achiote y un extracto natural que está en el espectro apropiado. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que más de un 50 % de los tocotrienoles son δ -T3 y γ -T3. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que más de un 50 % de los tocotrienoles son δ -T3. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que está exento de tocoferol.

- 5 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que los tocotrienoles C5 no sustituidos son > 60 % y los tocoferoles son < 15 %. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que los tocotrienoles C5 no sustituidos son > 70 % de tocotrienoles C5 no sustituidos y < 10 % de tocoferoles. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que los tocotrienoles C5 no sustituidos son >80 % de tocotrienoles C5 no sustituidos y < 5% de tocoferoles.
- Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que el procedimiento de uso de tocotrienol está exento de tocoferol, con > 98 % de tocotrienoles, y los tocotrienoles son predominantemente δ -T3 y γ -T3. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que el tocotrienol está exento de tocoferol, con > 98 % de tocotrienoles, y los tocotrienoles son predominantemente δ -T3.
- 10 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los tocoles C5 no sustituidos inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos (MBC) de superficie. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los T3 C5 no sustituidos de achiote inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos de superficie. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los T3 C5 no sustituidos de achiote inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de los monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario.
- 15 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los T3 C5 no sustituidos de achiote inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario, que causa la pérdida de integridad de los vasos.
- 20 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los T3 C5 no sustituidos de achiote inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario, que causa la pérdida de integridad de los vasos, y previenen enfermedades microvasculares y macrovasculares y aterosclerosis. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que comprende extracto de achiote en el que los T3 C5 no sustituidos de achiote inhiben los MBC y previenen eventos patológicos seleccionados del grupo consistente en quimiotactismo, vasoconstricción, hipercoagulación, glicoxidación y LDL oxidado por elevación de HDL.
- 25 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que el tocotrienol se combina con otros nutrientes. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que el tocotrienol se combina con otros nutrientes y el tocotrienol contiene geranilgeraniol. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol en el que el nutriente se selecciona del grupo consistente en fitoesteroles, orizanoles, policosanoles, pantetina, arroz de levadura roja (*Monascus*), salvado de avena, ajo, gugalípidos, quitosano, proteína de soja (p.ej., oligopéptidos y polipéptidos, hidrolizados), CoQ10, carnitina, magnesio, cromo, potasio, calcio, D-tirosina, fibras (de tipos insoluble y soluble, incluyendo β -glucanos), ω -3 (DHA y EPA, ALA) y lecitina.
- 30 Se da a conocer un procedimiento de uso de geranilgeraniol y tocotrienoles que aumenta la biosíntesis *de novo* de todos los grupos de isoprenoides intermedios posteriores y productos distales.
- 35 Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que contiene geranilgeraniol que aumenta anabólicamente la síntesis endógena *de novo* de CoQ10 mediante el alargamiento/prenilación por geranilgeraniol de la cadena lateral y, a la inversa, CoQ10 aumenta catabólicamente la síntesis endógena *de novo* de geranilgeraniol mediante β -oxidación de CoQ10.
- 40 Se da a conocer un procedimiento de suplementación que comprende la administración de un tocotrienol o un tocotrienol y geranilgeraniol, y la reducción de la ceguera inducida por *Chlamydia*.

Descripción detallada de la realización preferida

- 45 Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el tocotrienol contiene tocotrienol δ y tocotrienol γ , y en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:100 a 100:1. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el tocotrienol contiene tocotrienol δ y tocotrienol γ , y en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:25 a 25:1. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el tocotrienol contiene tocotrienol δ y tocotrienol γ , y en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:10 a 10:1. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el tocotrienol contiene tocotrienol δ y tocotrienol γ , y en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:5 a 5:1. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el tocotrienol contiene tocotrienol δ y tocotrienol γ , y en el que la relación de tocotrienoles δ a γ es de 1:1.
- 50

Se da a conocer un procedimiento administra un tocotrienol, en el que el procedimiento de uso de tocotrienol es una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, y en el que la mezcla tiene niveles estandarizados bajos de tocoferoles. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el procedimiento de uso de tocotrienol es una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, y en el que el nivel estandarizado de tocoferoles es ≤ 50 %. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el procedimiento de uso de tocotrienol es una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, y en el que el nivel estandarizado de tocoferoles es ≤ 20 %. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el procedimiento de uso de tocotrienol es una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, y en el que el nivel estandarizado de tocoferoles es ≤ 10 %. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el procedimiento de uso de tocotrienol es una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, y en el que el nivel estandarizado de tocoferoles es ≤ 1 %. Se da a conocer que el procedimiento administra un tocotrienol, en el que el extracto natural se selecciona del grupo consistente en un aceite vegetal de salvado de arroz, palma, semilla de arándano y semilla de lichi.

Se da a conocer que un procedimiento administra una mezcla de extracto de achiote y extracto natural que está en el espectro apropiado. Se da a conocer que el procedimiento administra una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, siendo más de un 50 % de los tocotrienoles δ -T3 y γ -T3. Se da a conocer que el procedimiento administra una mezcla de extracto de achiote y extracto natural, siendo más de un 50 % de los tocotrienoles δ -T3. Se da a conocer que el procedimiento administra una mezcla de extracto de achiote y extracto natural y que está exenta de tocoferol.

Se da a conocer que un procedimiento administra > 60 % de tocotrienoles C5 no sustituidos y < 15 % de tocoferoles. Se da a conocer que un procedimiento administra > 70 % de tocotrienoles C5 no sustituidos y < 10 % de tocoferoles. Se da a conocer que un procedimiento administra > 80 % de tocotrienoles C5 no sustituidos y < 5 % de tocoferoles.

Se da a conocer que un procedimiento administra un extracto de achiote y que el procedimiento de uso de tocotrienol está exento de tocoferol, con > 98 % de tocotrienoles, y los tocotrienoles son predominantemente δ -T3 y γ -T3. Se da a conocer que el procedimiento administra un extracto de achiote y está exento de tocoferol, con > 98 % de tocotrienoles, y los tocotrienoles son predominantemente δ -T3.

Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos que inhiben materiales bioactivos quimiotácticos de superficie. Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos en el que los tocoles C5 no sustituidos son T3 C5 no sustituidos y los T3 C5 no sustituidos inhiben materiales bioactivos quimiotácticos de superficie. Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos, en el que los tocoles C5 no sustituidos son T3 C5 no sustituidos y los T3 C5 no sustituidos inhiben materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario. Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos, en el que los tocoles C5 no sustituidos son T3 C5 no sustituidos y los T3 C5 no sustituidos inhiben materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario, que causa la pérdida de la integridad de los vasos. Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos, en el que los tocoles C5 no sustituidos son T3 C5 no sustituidos y los T3 C5 no sustituidos inhiben los materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen la unión o adhesión de monocitos y leucocitos en circulación sobre endotelio estacionario, que causa la pérdida de integridad de los vasos, y previenen las enfermedades microvasculares y macrovasculares y aterosclerosis. Se da a conocer que un procedimiento administra tocoles C5 no sustituidos, en el que los tocoles C5 no sustituidos son T3 C5 no sustituidos y los T3 C5 no sustituidos inhiben materiales bioactivos quimiotácticos de superficie y previenen eventos patológicos seleccionados del grupo consistente en quimiotactismo, vasoconstricción, hipercoagulación, glicoxidación y LDL oxidado por elevación de HDL.

Se da a conocer que un procedimiento administra un extracto de achiote y el extracto de achiote está combinado con otros nutrientes. Se da a conocer que un procedimiento administra un extracto de achiote y el extracto de achiote se combina con otros nutrientes, y el extracto de achiote contiene tocotrienol y geranilgeraniol. Se da a conocer que un procedimiento administra un extracto de achiote en el que el nutriente se selecciona del grupo consistente en fitoesteroles, orizanoles, policosanoles, pantetina, arroz de levadura roja (*Monascus*), salvado de avena, ajo, gulgúlipidos, quitosano, proteína de soja (p.ej., oligopéptidos y polipéptidos, hidrolizados), CoQ10, carnitina, magnesio, cromo, potasio, calcio, D-tirosina, fibras (de tipos insoluble y soluble, incluyendo β -glucanos), ω -3 (DHA y EPA, ALA) y lecitina. Se da a conocer que un procedimiento administra un extracto de achiote y un nutriente, y el nutriente se selecciona del grupo consistente en extracto de banaba (p.ej. ácido corosólico), ácidos lipoiicos (todas las formas isoméricas), cromo y las vitaminas B, incluyendo niacina.

Se da a conocer que un procedimiento administra geranilgeraniol y tocotrienoles C5 no sustituidos exentos de tocoferol. Se da a conocer que el procedimiento administra geranilgeraniol, tocotrienoles C5 no sustituidos exentos de tocoferol e ingredientes inactivos y/o activos.

Se da a conocer también un procedimiento de uso de tocotrienol que contiene geranilgeranoles que trata una enfermedad del sistema nervioso. Se da a conocer un procedimiento de uso de tocotrienol que contiene geranilgeranoles que trata una enfermedad del sistema nervioso, en la que la enfermedad se selecciona del grupo consistente en enfermedad de Alzheimer crónica, enfermedad de Parkinson, disautonomía familiar, esclerosis muscular y atrofia muscular.

5

En el presente contexto, se da a conocer también lo siguiente con referencia a los párrafos numerados siguientes:

1. Un procedimiento de tratamiento de una infección por *Chlamydia*, que comprende administrar la vitamina E tococromanol a un mamífero necesitado de tratamiento.

10

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que el tratamiento inhibe el ciclo celular de desarrollo e infección de *Chlamydia*.

3. El procedimiento del párrafo 1, en el que el tratamiento previene el ciclo celular de desarrollo e infección de *Chlamydia*.

4. El procedimiento del párrafo 1, en el que el tratamiento desestabiliza el ciclo celular de desarrollo e infección de *Chlamydia*.

15

5. El procedimiento del párrafo 1, que comprende adicionalmente administrar un geranilgeraniol.

6. El procedimiento del párrafo 1, en el que el mamífero tiene una afección seleccionada del grupo consistente en calcio intracelular elevado, expresión aumentada de caveolas, vasoconstricción aumentada, hipertensión e hipertensión pulmonar primaria.

20

7. El procedimiento del párrafo 1, en el que la vitamina E tococromanol se selecciona del grupo consistente en un tocoferol natural, un tocoferol sintético, un tocotrienol natural y un tocotrienol sintético.

8. El procedimiento del párrafo 7, en el que el tocotrienol es un isómero de tocotrienol.

9. El procedimiento del párrafo 8, en el que el isómero de tocotrienol se selecciona del grupo consistente en α , β , γ , δ , desmetilo y didesmetilo.

10. El procedimiento del párrafo 7, en el que el tocoferol es un isómero de tocoferol.

25

11. El procedimiento del párrafo 10, en el que el isómero de tocoferol se selecciona del grupo consistente en α , β , γ , δ , desmetilo y didesmetilo.

12. El procedimiento del párrafo 1, en el que la *Chlamydia* se selecciona del grupo consistente en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydiophila pneumoniae*, *Chlamydiophila psittaci*, *Chlamydiophila pecorum*, *Chlamydiophila abortis*, *Chlamydiophila felis* y *Chlamydiophila caviae*.

30

13. El procedimiento del párrafo 1, en el que el tocotrienol dificulta el crecimiento e inhibe la maduración en *Chlamydia* de cuerpos reticulados hasta cuerpos elementales, previniendo su progresión y desarrollo.

14. El procedimiento del párrafo 1, en el que el tocotrienol reduce la infección por *Chlamydia* de un leucocito.

15. El procedimiento del párrafo 14, en el que el leucocito se selecciona del grupo consistente en neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.

35

16. El procedimiento del párrafo 7, en el que el tocotrienol reduce el colesterol en pacientes hipercolesterolémicos para inhibir la infección por *Chlamydia*.

17. Un procedimiento de tratamiento de una infección por *Chlamydia*, que comprende administrar un agente que restrinja el colesterol.

40

18. El procedimiento del párrafo 17, en el que el agente que restringe el colesterol se selecciona del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un

orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω 3, una lecitina, ajo, un gugulípido, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura roja y un mineral.

19. El procedimiento del párrafo 18, en el que el bioflavonoide se selecciona del grupo consistente en bioflavonoide cítrico y flavona polimetoxilada.
- 5 20. El procedimiento del párrafo 1, en el que el modo de aplicación de la vitamina E tococromanol se selecciona del grupo consistente en pulverizador en aerosol, ingestión oral, cremas, duchas, lociones y gotas oculares.
21. El procedimiento de 20, que comprende administrar una dosis de tocotrienol de entre 10 mg y 1.000 mg al día.
- 10 22. El procedimiento de 21, que comprende administrar una dosis de tocotrienol de entre 20 mg y 500 mg al día.
23. El procedimiento de 22, que comprende administrar una dosis de tocotrienol de entre 50 y 150 mg al día.
24. Un procedimiento de tratamiento de una infección por *Chlamydia*, que comprende administrar una combinación de tocotrienol y al menos un agente seleccionado del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω 3, una lecitina, ajo, un gugulípido, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura roja y un mineral.
- 15 25. Un procedimiento de tratamiento de una infección por *Chlamydia*, que comprende administrar una combinación de flavona polimetoxilada y al menos un agente seleccionado del grupo consistente en un tocotrienol, una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω 3, una lecitina, ajo, un gugulípido, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura roja y un mineral.
- 20 26. Un procedimiento de tratamiento de enfermedades asociadas a *Chlamydia*, que comprende administrar un agente hipocolesterolémico a un mamífero o ave para tratar una enfermedad asociada a *Chlamydia* seleccionada del grupo consistente en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual, infección del tracto genital, artritis, prediabetes, síndrome metabólico, diabetes, síndrome del ovario poliquístico (SOP), infección del tracto respiratorio, neumonía, infección ocular, enfermedad neurológica, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- 25 27. El procedimiento del párrafo 26, en el que el agente hipocolesterolémico es un tocotrienol.
28. El procedimiento del párrafo 27, en el que el tocotrienol inhibe el calcio intracelular [Ca^{2+}] y la expresión de caveolas, y reduce así la vasoconstricción e hipertensión pulmonar primaria (HPP), e inhibe por lo tanto la infección por *Chlamydia* asociada a la hipertensión.
- 30 29. Un procedimiento para mejorar la inmunidad ante *Chlamydia*, que comprende administrar un tocotrienol a un mamífero para potenciar una célula dendrítica presentadora de antígeno y mejorar la inmunidad ante *Chlamydia*.
- 30 30. Un procedimiento para inhibir la progresión de un cáncer, que comprende administrar un tocotrienol a un mamífero para potenciar una célula dendrítica presentadora de antígeno e inhibir la progresión de un cáncer.
- 35

Otras realizaciones

Ha de entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la descripción anterior ilustre el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, aunque la descripción anterior se refiere a células humanas, diversos aspectos de la invención podrían aplicarse también a células de otros animales (p.ej., mamíferos, aves, peces, crustáceos y animales domésticos y de granja) haciendo las modificaciones apropiadas a los procedimientos descritos.

40

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 ilustra el ciclo de desarrollo de *Chlamydia*. En la etapa (1), los cuerpos elementales (CE) infectan células hospedadoras mediante un proceso similar a la endocitosis mediada por receptor, y forman una estructura de tipo

45

vacuola llamada inclusión (2). Los CE se transforman entonces en cuerpos reticulados (CR) no infecciosos, en cuyo estado se replican y empujan el núcleo a un lado de la célula (2→3). La inclusión crece, los CR se vuelven a transformar en CE (3) y la inclusión eventualmente lisa la célula (4). Los CE infecciosos liberados son ahora capaces de reinfectar las células hospedadoras circundantes.

5 La Figura 2 ilustra la estructura molecular y química del tocotrienol δ . El tocotrienol δ es un compuesto de la vitamina E con un núcleo de cromanol (sitio de actividad antioxidante, típico de todos los compuestos de vitamina E) y una cola de isoprenoide (cola de farnesilo). La cola farnesilada regula negativamente la enzima biosintética de colesterol limitante de la velocidad, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Parker *et al.*, 1993). Esta inhibición del colesterol por el tocotrienol δ es única para los compuestos de vitamina E farnesilados. Entre los isómeros conocidos de tocotrienol están tocotrienol α , β , γ y δ . La potencia de inhibición del colesterol por estos isómeros es tocotrienol $\delta > \gamma > \beta > \alpha$. Aparentemente, los desmetiltocotrienoles son más activos, especialmente en ausencia de un grupo metilo en C5 del anillo de benceno (véase la flecha). El tocotrienol δ está monometilado en posición 8 del anillo de benceno, haciéndolo el menos sustituido, y por lo tanto el isómero más potente de los cuatro compuestos comunes de tocotrienol (Tan, 2005).

15 La Figura 3 ilustra células de macrófago de ratón infectadas por *Chlamydia* tratadas con tocotrienol δ (400 aumentos). Se pretrataron los macrófagos de ratón (células J774A.1) con una concentración 30 $\mu\text{mol/l}$ de tocotrienol δ en cultivo durante 4 horas y se infectaron con *C. trachomatis* SVK durante 48 horas. Las flechas indican inclusiones. Las células se observaron y documentaron digitalmente usando un sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta a 400 aumentos. Las flechas blancas apuntan a las inclusiones características (la escala indica 50 μm).

20 La Figura 4 ilustra células de macrófago de ratón infectadas por *Chlamydia* tratadas con tocotrienol δ (630 aumentos). Las flechas blancas apuntan a células representativas. Se observan numerosas inclusiones muy pequeñas no fusionadas en A (la escala indica 50 μm).

La Figura 5 ilustra la citometría de flujo en linfocitos B humanos infectados por *Chlamydia* tratados con tocotrienol δ . Se trataron las células de linfocitos B humanos (JY) con una concentración 30 $\mu\text{mol/l}$ de tocotrienol δ en cultivo durante 4 horas y se infectaron con *C. trachomatis* SVK durante 24-72 horas. Se detectaron las células inmunofluorescentes positivas de *Chlamydia* por citometría de flujo.

30 La Figura 6 ilustra la detección y cuantificación de leucocitos infectados por *Chlamydia* en pacientes hiperlipidémicos con suplemento de tocotrienol δ . Se inmunotifaron capas leucocíticas de pacientes hiperlipidémicos y se valoraron para cada muestra alícuotas de 10.0000 células. Se muestra en el panel izquierdo una gráfica de puntos de un paciente hiperlipidémico antes del suplemento con tocotrienol δ , y se muestra en el panel derecho una gráfica de puntos de un paciente hiperlipidémico después de 2 meses de suplemento con tocotrienol δ (100 mg/día).

La Figura 7 ilustra células de tumor mamario humano infectadas por *Chlamydia* tratadas con tocotrienol δ (630 aumentos). Se infectaron las células de tumor mamario humano (TMX2-28) con *Chlamydia* durante 72 horas y se trataron con una concentración 15 $\mu\text{mol/l}$ de tocotrienol δ (Figura 7A). Los controles se dejaron sin tratar (Figura 7B).

35 Descripción detallada de la invención

El ciclo de desarrollo de *Chlamydia* consiste en el cuerpo elemental (CE) infeccioso, pero metabólicamente inactivo, que iniciará la entrada en la célula, y el cuerpo reticulado (CR) metabólicamente activo, pero no infeccioso, que se replica en la célula y se diferencia de vuelta en CE antes de liberar por la célula infectada [Figura 1].

40 Los microbios usurpan las rutas endocíticas de las células hospedadoras normales para conseguir entrar. Se ha encontrado que varios agentes infecciosos, incluyendo virus y parásitos intracelulares, entran en células hospedadoras a través de caveolas o balsas. Se proponen muchos mecanismos para la entrada de *Chlamydia* en células hospedadoras. Estos incluyen las caveolas de tipo paso, la clatrina de tipo cavidad y/u otras rutas. Puesto que solo la forma de CE de *Chlamydia* es infecciosa y los CE de 300 nm son aproximadamente 3 veces más grandes que caveolas o clatrina (ambos de aprox. 100 nm), parece improbable que *Chlamydia* entre en las células hospedadoras mediante estos mecanismos. La entrada de *Chlamydia* en células hospedadoras y posterior infección requiere balsas lipídicas, especialmente aquellas que son ricas en el contenido de colesterol. Una captura elevada de colesterol mediante precipitación/quelación de colesterol (Stuart *et al.*, 2003), así como la inhibición de la síntesis de colesterol usando fármacos antihiperlipidémicos (Yamazaki *et al.*, 2006) interfiere con la endocitosis por células hospedadoras de *Chlamydia*. Por lo tanto, es más probable que *Chlamydia* entre en las células a través de balsas lipídicas que en alguna forma de envoltura caveolar (invaginación). Además, se ha encontrado que las estatinas desestabilizan las caveolas en células endoteliales vasculares humanas, proporcionando por tanto una ruta alternativa de inhibición de *Chlamydia* (Ling y Bunday, 2006), desconocida hasta ahora. Dicha ruta de inhibición de *Chlamydia* puede apoyarse adicionalmente mediante la reducción del colesterol por estatina. La endocitosis mediada por balsa puede utilizar un proceso de tipo cremallera, mediante el cual los lípidos se fusionan o coalescen

con los CE para facilitar la entrada. Dicha fusión de materiales de colesterol con los CE es plausible, puesto que *Chlamydia* no puede sintetizar sus propios lípidos, y es conocida por obtener colesterol a partir de su hospedador. Este colesterol del hospedador puede ser de síntesis *de novo* en la célula hospedadora o de la circulación sistémica *ex vivo*, donde se transportaba desde el hígado. *Chlamydia* obtiene el colesterol preferiblemente de fuentes extracelulares mediante tránsito por el aparato de Golgi, que se encuentra entonces en grandes cantidades en la membrana de inclusión de *Chlamydia* (Carabeo *et al.*, 2003). El colesterol sintetizado *de novo* está mediado por intermedios de transporte ricos en lípidos mediante transporte a la membrana plasmática dependiente de energía y temperatura.

En un estudio clínico de 2 años sobre pacientes hiperlipidémicos positivos de *C. pneumoniae*, el fármaco reductor del colesterol pravastatina no inducía una disminución significativa del colesterol total y LDL-colesterol (caída de 1-2 %), pero reducía la aterosclerosis de carótida significativamente un 12 % (Sawayama *et al.*, 2003). Este estudio es instructivo porque si estos pacientes no fueran positivos de *Chlamydia*, podrían haberse reducido significativamente los niveles de colesterol mediante la administración de pravastatina, y la aterosclerosis de carótida podría haberse reducido más de un 12 %. Otro estudio encontró que las células infectadas por *Chlamydia* mostraban una captación potenciada de LDL en macrófagos, contribuyendo así a la formación de células de espuma y una eventual lesión aterogénica. Considerados conjuntamente, estos estudios implican que existe una relación entre la infección por *Chlamydia*, el colesterol y la aterosclerosis de carótida. Los estudios patológicos previos han mostrado una asociación positiva entre la infección previa o actual por *C. pneumoniae* y la enfermedad arterial coronaria (Grayston *et al.*, 1990). De forma interesante, en un estudio de 4 años, el tocotrienol causó una regresión de la aterosclerosis de carótida humana sin una caída significativa de colesterol (Kooyenga *et al.*, 2001).

Los tocotrienoles [Figura 2] pertenecen al mismo grupo de la vitamina E que los tocoferoles, y su estructura de anillo da a estos compuestos propiedades antioxidantes. El tocotrienol inhibe específicamente la síntesis *de novo* del colesterol mediante la ruta de HMG-CoA reductasa. Se espera que el tocotrienol, al reducir el LDL sistémico, comprometa la constitución de balsas lipídicas ricas en colesterol en las membranas externas de células hospedadoras. De forma importante, el tocotrienol inhibe la adhesión de monocito-célula endotelial, lo que a su vez ayuda a una distribución más uniforme en la bicapa de membrana, y reduce en gran medida el riesgo de desarrollo de lesiones ateroescleróticas. Por lo tanto, se espera adicionalmente que el tocotrienol inhiba la infección del patógeno en el hospedador mediante la adhesión de *Chlamydia* al hospedador.

Una vez ha ocurrido la entrada de *Chlamydia* a las células hospedadoras, las bacterias tienen la necesidad continua de colesterol para continuar el desarrollo del patógeno. Este colesterol deriva específicamente de la membrana de las células hospedadoras (Azenabor, 2005), y se ha mostrado que este proceso está mediado por los orgánulos de Golgi (Carabeo *et al.*, 2003). El agotamiento del colesterol de la membrana celular ocurre debido a que la inclusión de *Chlamydia* intercepta el colesterol que produce la célula hospedadora, haciéndolo indisponible para las membranas de la célula hospedadora. Esto da como resultado fluidez de membrana, una adherencia aumentada de macrófagos a células endoteliales y posteriormente el riesgo de desarrollo de lesiones aterogénicas. Se espera que el tocotrienol inhiba la síntesis intracelular de colesterol, reduciendo por tanto la interceptación de colesterol y el tránsito por el aparato de Golgi de colesterol por *Chlamydia*. Por lo tanto, se espera que el tocotrienol inhiba la progresión o desarrollo de *Chlamydia* de CR a CE, y limite a la vez el proceso de aumento de la formación de inclusiones de *Chlamydia*. Finalmente, esto reduciría o retardaría la replicación bacteriana en células infectadas que apoyan la infección posterior de células hospedadoras no infectadas, que ocurre después de la lisis de células hospedadoras infectadas por *Chlamydia* [Figura 1, etapas 4→1]. Puede ser también posible que la entrada de *Chlamydia* mediada por balsa lipídica no sea necesaria para la infección (Gabel *et al.*, 2004). Por lo tanto, el tocotrienol puede inhibir la infección por *Chlamydia* en un mecanismo o mecanismos aparte de la ruta de reducción del colesterol. No obstante, el tocotrienol inhibe la infección por *Chlamydia*. Sin embargo, la ruta de reducción del colesterol puede seguir dando cuenta de la inhibición de la progresión de *Chlamydia*.

Por lo tanto, el resumen de esta invención es que el tocotrienol δ inhibe la síntesis *de novo* de colesterol, desestabilizando o inhibiendo la formación de balsas lipídicas, aunque su implicación en la restricción de las balsas lipídicas pueda no ser necesaria. Mediante esta invención, el tocotrienol restringe o detiene la entrada (endocitosis) a través de adhesión de patógeno-hospedador y la progresión de las diversas etapas del ciclo de desarrollo de *Chlamydia*. El tocotrienol δ puede tener un doble fin de prevención simultánea de la infección y freno de la progresión del desarrollo normal de *Chlamydia* que conduciría a la formación de nuevos CE infecciosos. Por lo tanto, esta invención describe que la inhibición del colesterol en las balsas lipídicas ricas en colesterol impide la progresión de la infección por *Chlamydia* en todas sus etapas de desarrollo.

Definiciones

Suplementos nutricionales variados: Esteroles vegetales, orizanoles, ácido corosólico, policosanoles, vitaminas B (p.ej., pentatrina, niacina, carnitina, ácido α -lipoico, taurina), CoQ10, ácidos grasos ω 3 (p.ej., DHA, EPA, ácido α -linoleico), lecitinas (p.ej., fosfatidilcolina, serina, etanolamina, inositol), ajo, gurgulípidos, fibras insolubles y solubles,

proteína de soja (p.ej., oligopéptidos y polipéptidos, hidrolizados), quitosano, arroz de levadura roja (*Monascus*) y minerales (p.ej., magnesio, calcio, cromo, potasio).

5 **Caveolas:** Pequeñas bolsas, vesículas, cavidades o huecos que comunican con el exterior de una célula y se extienden hacia dentro, causando mellas en el citoplasma y la membrana celular. Dichas caveolas pueden desprenderse formando vesículas libres en el citoplasma. Se consideran sitios para la captación de materiales en la célula, y son una de las rutas que toma *Chlamydia* para entrar en células hospedadoras. Las caveolas son también sitios de expulsión de materiales de la célula, o sitios de adición o retirada de membrana celular (unitaria) hasta o desde la superficie celular.

10 **Chlamydia:** Bacterias que pertenecen a la orden de las *Chlamydiales* y están incluidas en la familia de los organismos intracelulares obligados, que incluye otras bacterias intracelulares obligadas, virus y parásitos, así como las diferentes especies de *Chlamydia* tales como *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia caviae*, *Chlamydia suis* y *Chlamydia muridarum*.

15 **Infección por Chlamydia:** Infección inicial de células hospedadoras por *Chlamydia*. Esto ocurre con la forma morfológica infecciosa de *Chlamydia*, el cuerpo elemental (véase la Figura 1).

Progresión de Chlamydia: Desarrollo de *Chlamydia* en células hospedadoras. Esto implica la transformación del cuerpo elemental infeccioso en el cuerpo reticulado no infeccioso, la transformación de nuevo a la forma de cuerpo elemental infeccioso y el crecimiento de la inclusión que contiene *Chlamydia* hasta el punto de la lisis celular (véase la Figura 1).

20 **Reinfección por Chlamydia:** A la terminación del ciclo de desarrollo de *Chlamydia*, la célula hospedadora infectada experimenta lisis celular, liberando cuerpos elementales infecciosos (véase la Figura 1). Estos cuerpos elementales infecciosos infectan entonces las células hospedadoras vecinas.

25 **Enfermedades relacionadas con Chlamydia:** Enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual e infección del tracto genital, artritis, infección del tracto respiratorio y neumonía, infección ocular, enfermedades neurológicas incluyendo enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.

Depresiones recubiertas de clatrina: Implicadas en la internalización de ligandos unidos a receptor por endocitosis mediada por receptor. Esta es una de las rutas que usa *Chlamydia* para entrar en una célula.

30 **Fármacos reductores del colesterol:** Estatinas (p.ej. lovastatina, simvastatina, pravastatina), bioflavonoides cítricos o flavonas específicamente polimetoxiladas (p.ej., tangeretina, nobiletina, hesperidina, rutina), polifenoles (p.ej., EGCG, catequinas, resveratrol).

Balsas lipídicas: Dominios ricos en esfingolípidos y colesterol en la membrana celular. Estos dominios son dominios ricos en glucolípidos insolubles en detergente y se mueven dentro de la bicapa fluida. Estas balsas lipídicas son una de las rutas mediante las que *Chlamydia* entra en células hospedadoras.

35 **Tococromanol:** Vitamina E. Esto incluye todos los isómeros individuales de tocoferol y tocotrienol, fracciones ricas en tocotrienol de fuentes naturales tales como palma, arroz y achiote y vitamina E de diversos espectros (p.ej. espectros completos y apropiados).

Ejemplos

Ejemplo 1

40 **Cepas de Chlamydia:** Se hicieron crecer soluciones madre de *C. trachomatis* serovar K/VR887 en células J774A.1 sin ayuda de centrifugación. Se lisaron las células infectadas, se tomaron alícuotas de esta solución madre y se congelaron en medio de congelación SPG (75,0 g de sacarosa, 0,52 g de fosfato de potasio, 1,22 g de fosfato de sodio dibásico, 0,72 g de ácido glutámico, diluido en 100 ml de H₂O). Se almacenaron estas alícuotas en N₂ líquido o a -80 °C, y se descongelaron después para usar para infectar monocapas.

45 **Líneas celulares usadas:** Se obtuvieron macrófagos de ratón (J774A.1), células de tumor mamario humano (MCF-7) y células epiteliales humanas (Hep-2) de la American Type Culture Collection. Las células de tumor mamario humano (TMX2-28) fueron un amable obsequio del Dr. Arcaro, y los linfocitos B humanos (JY) fueron un amable obsequio del Dr. Eric Martz. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio MEM con insulina mejorado por

Richter (IMEMZO, Irvine Scientific, Santa Ana, CA) con 5 % de suero fetal bovino (FBS, Atlanta Biologicals, Norcross, Ga.). Se hicieron crecer las células hasta 80 % de confluencia sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de 12 pocillos (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Se realizó una dilución de 1:125 o 1:200 de la solución madre de *C. trachomatis* serovar K usando los medios de superposición de cicloheximida completos estándares (Bio-Whittaker, Walkersville, Md.) que contienen 10 % de FBS, y 1× L-glutamina (CCOM). Se recubrió esto sobre el cubreobjetos que contiene monocapas y se incubó durante 24-48 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Se recogieron los cubreobjetos con las monocapas, se aclararon con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con metanol frío al 70 %, se almacenaron y se inmunotifieron posteriormente.

Tratamiento con tocotrienol δ: Se diluyó una solución madre de tocotrienol δ (98 % de pureza, American River Nutrition, Hadley, Mass.) a 1 mg/1 ml en etanol absoluto [EtOH]. Se trataron monocapas confluentes de células J774A.1, MCF-7, TMX2-28, JY o Hep-2 con concentraciones 5, 10, 20, 30 o 40 μmol/l de tocotrienol δ. El tratamiento ocurrió 5 horas antes de la infección por *C. trachomatis* serovar K, en el punto de infección o 3 horas después de la infección.

Inmunotinción: Brevemente, se inmunotifieron las células infectadas con una dilución 1:2 de anticuerpo policlonal de conejillo de Indias anti-*Chlamydia* (Biomeda, Foster City, CA), o una dilución 1:125 de suero completo de CE de conejo anti-*Chlamydia* durante 1 hora a 37 °C. Después de aclarar 3 veces con PBS, se detectaron los anticuerpos unidos usando una dilución 1:100 de anticuerpo de burro anti-conejillo de Indias conjugado con FITC o una dilución 1:125 de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con TRITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Después de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y 3 aclarados con PBS, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos usando Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) o medio de montaje Vectashield® con DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y entonces se sellaron. Inicialmente, se examinaron los portaobjetos a 400 aumentos usando un Nikon LABPHOT-2. Para fotografiar, se valoraron los portaobjetos en la Massachusetts Central Microscopy Facility usando un sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta y 630 aumentos. Se capturaron imágenes y se combinaron las relevantes usando el software de procesamiento de imágenes Confocal Assistant™ versión 4.02.

A estos aumentos, se visualizaron fácilmente las diferencias en el número de inclusiones presentes en la muestra tratada con tocotrienol (Figura 3A) y el control (Figura 3B). Como señalan las flechas blancas, no se encontró evidencia de inclusiones maduras grandes con el tratamiento con tocotrienol, mientras que las células no tratadas (3B) ejemplifican un alto nivel de infección por *Chlamydia*, como se muestra por el alto número y tamaño de las inclusiones presentes.

Cuantitativamente, la tinción por inmunofluorescencia mostró que el número de inclusiones de *Chlamydia* había disminuido significativamente en las células tratadas con tocotrienol (Figura 3, Tabla 1). Esto mostró que la infección inicial por CE de *Chlamydia* de células hospedadoras estaba impedida y suprimida (Figura 1, etapa 1).

Ejemplo 2

Se usaron en este estudio los procedimientos del ejemplo 1. Se trataron las células en cultivo con concentraciones de tocotrienol δ de 5, 10, 20, 30 y 40 nmol/l, en las que el compuesto viscoso de vitamina E se diluye en EtOH al 100 % sin citotoxicidad. Los controles incubados con las correspondientes cantidades de EtOH, así como controles incubados con tocotrienol δ diluido en EtOH, no mostraron diferencia en el número de células cuando se comparaban con las células crecidas en medio de cultivo. A 630 aumentos, se observó diferencia de tamaño y morfología de las inclusiones cuando se comparaba la muestra tratada con tocotrienol (Figura 4A) con el control (Figura 4B). Las inclusiones en (4A) eran pequeñas, y no se fusionaban con la morfología de las inclusiones maduras. En (4B), las inclusiones eran maduras, grandes y fuertemente teñidas. Las secciones ópticas a través del eje Z (tercera dimensión) demuestran que estas células no tratadas (4B) eran tres veces más gruesas que las células tratadas con tocotrienol (4A). Por lo tanto, se esperaría que los volúmenes de inclusión de *Chlamydia* fueran incluso mayores (véase el Ejemplo 3).

Las inclusiones de *Chlamydia* en células que se trataron con mayores concentraciones (20-40 μmol/l) de tocotrienol δ eran inmaduras, pequeñas y menos redondas cuando se visualizaban por tinción de inmunofluorescencia específica de *Chlamydia* (Figura 4). Esta observación mostró que el desarrollo de *Chlamydia* en la célula hospedadora se inhibía en gran medida (Figura 1, etapa 2-3).

Ejemplo 3

Tabla 1. Sumario del recuento de inclusiones y células de macrófagos de ratón

Inclusiones (por campo de visión)	Primera infección		Segunda infección		Tercera infección	
	Tratada	Control	Tratada	Control	Tratada	Control
Grande (15- 20 μm)	0,7	2,6	1,4	2,6	0,7	1,2
Pequeña (\leq 10 μm)	4,5	10,0	0,6	3,2	1,1	2,1
Total	5,2	12,6	2,0	5,8	1,8	3,3
Total/célula	0,058	0,111	0,032	0,073	0,016	0,041
Inhibición porcentual	52,3 %		43,8 %		39,0 %	

*Los controles eran células que se infectaron, pero nunca se trataron con tocotrienol δ

5 Se usaron en este estudio los procedimientos del ejemplo 1. Los recuentos en todos los cubreobjetos con condiciones experimentales como en las Figuras 3 y 4 se realizaron para una medida de 10 campos de visión. Se trataron las células con concentraciones 30 $\mu\text{mol/l}$ de tocotrienol δ . Se estudió la reinfektividad, con transferencia del sobrenadante que contiene cuerpos elementales (CE) infecciosos desde células infectadas tratadas con tocotrienol hasta células no infectadas tratadas con tocotrienol (Tabla 1).

10 Esta observación sugería que el uso repetido de tocotrienol δ reduce significativamente el nivel de infección por *Chlamydia*, y mostraba que el tocotrienol δ inhibía la reinfeción de células hospedadoras por CE de *Chlamydia* (Figura 1, etapa 4 \rightarrow 1). Por lo tanto, el tocotrienol ayudaba a las células hospedadoras a resistir los intentos repetidos de infección por *Chlamydia*.

15 La inhibición porcentual de la formación de inclusiones en células tratadas con tocotrienol, en comparación con no tratadas, era de aproximadamente 40-50 % (Tabla 1). Debería observarse también que las inclusiones grandes de las células de control eran más grandes (20 μm ; más como la Figura 1, etapa 2 \rightarrow 3) que las inclusiones grandes en las células tratadas con tocotrienol (10-15 μm ; más como la Figura 1, etapa 1 \rightarrow 2). Por ejemplo, las inclusiones de *Chlamydia* tratadas con tocotrienol eran típicamente 2-3 veces menores (ejes X-Y) y 3 veces más finas (eje Z, Ejemplo 2) que las inclusiones en las células de control. El volumen de inclusión de *Chlamydia* así calculado (2 \times 3 a 3 \times 3) era 6-9 veces menor, sugiriendo que el tocotrienol inhibía eficazmente el ciclo celular normal de *Chlamydia* (Figura 1, etapas 1 \rightarrow 2 y 2 \rightarrow 3).

20

El efecto global del tocotrienol δ sobre células infectadas por *Chlamydia* era que reducía la infección al influir en la infectividad del patógeno e inhibir su desarrollo normal (Tabla 1, Figuras 3 y 4), comprometiendo por tanto el ciclo de desarrollo completo del patógeno (Figura 1). Este estudio mostró que dosis repetidas de tocotrienol combaten la infección y progresión de *Chlamydia*.

25 Es probable que el control y erradicación de *Chlamydia* en seres humanos requiera suplementos de tocotrienol durante un periodo extenso de tiempo. A la vista de esto, los tocotrienoles y otros agentes (tales como tangeretina, nobiletina, EGCG y resveratol; más en el Ejemplo 7) en monoterapias o en combinación son superiores debido a su falta de toxicidad. En contraposición, otros fármacos (tales como las estatinas) tienen toxicidades mantenidas con el uso crónico. Esta invención destaca el uso de productos naturales seguros para luchar contra infecciones.

30 Ejemplo 4

Se usaron en este estudio los procedimientos del Ejemplo 1. Se analizó en las muestras si portaban células infectadas por *Chlamydia* mediante FACScan (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

35 Para cada periodo, la infección disminuyó con el tratamiento con tocotrienol δ . La inhibición de *Chlamydia* en células JY era al menos del doble durante un periodo de infección de 72 horas, con una inhibición máxima de 2,6 veces a las 36 horas (Figura 5).

Claramente, la inhibición de *Chlamydia* era eficaz en un periodo tan corto como 1 día y, después de un solo tratamiento con tocotrienol, el efecto era persistente durante al menos 3 días. Este estudio proporcionado mostraba que al menos una dosis de una vez de tocotrienol es eficaz frente a *Chlamydia*.

Ejemplo 5

5 Valoración por citometría de flujo de leucocitos: La cuantificación por citometría de flujo (CF) de leucocitos periféricos infectados por *Chlamydia* usaba capas leucocíticas (CL) aclaradas con PBS de muestras de HP. Se fijaron las células de CL y se permeabilizaron (1 % de paraformaldehído y 1 % de Triton X-100, 10 min a TA; Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI). Se incubaron separadamente las CL durante 1 hora con una dilución 1:200 de anticuerpo primario de conejo anti-*Chlamydia* (Biodesign International, Saco, ME), seguido de incubación de 1 hora con una dilución 1:150 de IgG de cabra anti-conejo conjugada con FITC (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), se aclaró con PBS tres veces y se monodispersó mediante paso a través de un filtro de malla de nailon (Lab-Line Instruments Inc, Melrose Park, IL). Se añadieron suficientes leucocitos para obtener 10.000 células/tubo y se analizó en las muestras si portaban células infectadas por *Chlamydia* mediante FACScan (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J.).

15 En este paciente (Figura 6), el consumo de tocotrienol redujo la granularidad y cantidad de células infectadas por *Chlamydia*, que se representa por la población negativa de *Chlamydia* en el cuadrante inferior izquierdo del panel.

Puesto que la citometría de flujo muestrea una población celular mayor [~10.000 células], este estudio humano apoyaba y corroboraba adicionalmente la inhibición de *Chlamydia* observada en los estudios microscópicos de células infectadas por *Chlamydia* tratadas *in vitro* (Figuras 3 y 4) y mostrada en los cuatro ejemplos anteriores.

20 Este estudio muestra que el tocotrienol es eficaz en seres humanos frente a *Chlamydia* como se representa por los leucocitos en circulación, incluyendo neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.

Ejemplo 6

Tabla 2. Comparación de los niveles de LDL y estado de infección por *Chlamydia* en pacientes hiperlipidémicos con suplemento de tocotrienol δ

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
% de disminución de LDL	20 %	7 %	25 %
Estado de infección por <i>Chlamydia</i> antes de suplemento con tocotrienol δ	Negativo	Positivo	Fuertemente positivo
Estado de infección por <i>Chlamydia</i> después de suplemento con tocotrienol δ	Negativo	Negativo	Negativo

25 Detección de leucocitos infectados por *Chlamydia*: Se fijaron frotis de sangre entera de cada muestra de sangre HP hiperlipidémica de 10 ml, edad media del donante 54 años, con MeOH al 70 % para posterior tinción. La inmunotinción usó una dilución 1:125 de anticuerpo policlonal de CE de conejo anti-*Chlamydia* seguido de una dilución 1:125 de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con TRITC (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se incubaron los portaobjetos a temperatura ambiente durante 1 hora con cada anticuerpo diluido, se aclararon, se montaron y se sellaron como se describe anteriormente. Se tomaron imágenes digitales de secciones ópticas de estas muestras con un sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta.

En un estudio clínico, se inmunotifieron capas leucocíticas de muestras de sangre extraídas tanto antes como después del suplemento con tocotrienol δ para la detección de células infectadas por *Chlamydia*. Se ensayaron en las muestras los niveles de LDL tanto antes como después del suplemento con tocotrienol δ .

35 El tocotrienol redujo el colesterol en pacientes con o sin infección previa por *Chlamydia*. Aparentemente, la caída de colesterol era más significativa cuando el paciente hiperlipidémico era negativo de *Chlamydia* (paciente 1 frente a 2). Como se discute anteriormente (Sawayama *et al.*, 2003), la pravastatina reducía el colesterol solo marginalmente en pacientes positivos de *Chlamydia*, a pesar de que las placas carótidas se reducían significativamente. Esto es consistente con el estudio clínico de 4 años descrito anteriormente, en el que los pacientes que tomaron tocotrienoles tenían una regresión de arteriosclerosis de carótida progresiva, pero su colesterol no caía hasta el cuarto año (Kooyenga *et al.*, 2001).

Sin embargo, en el paciente 2, el estado de infección por *Chlamydia* se invirtió de positivo a negativo con el suplemento de tocotrienol. Cuando la inhibición de *Chlamydia* respondía fuertemente al suplemento de tocotrienol (paciente 3), la caída de colesterol era también mayor, similar al paciente que era negativo de *Chlamydia*. Puesto que el tocotrienol es conocido por reducir el colesterol, dicha restricción de síntesis del colesterol inhibía el crecimiento que requería colesterol de *Chlamydia* (Carabeo, 2003), observado en los pacientes 2 y 3.

El suplemento de tocotrienol reducía el nivel de colesterol e infección por *Chlamydia* en pacientes hiperlipidémicos, y volvía negativo el estado de infección por *Chlamydia*.

Ejemplo 7

Es un corolario del ejemplo 6 que cualquier agente que restrinja la síntesis de colesterol prevendría o retardaría por lo tanto que *Chlamydia* intercepte colesterol. Dichos agentes incluyen estatinas (p.ej. lovastatina, simvastatina, pravastatina), bioflavonoides cítricos o flavonas específicamente polimetoxiladas (p. ej. tangeretina, nobiletina, hesperidina, rutina; English, 2004), polifenoles (p.ej. EGCG, catequinas, resveratrol; Yamazaki, 2005), y una selección de suplementos nutricionales (p.ej., esteroles vegetales, vitaminas B, ácidos grasos ω 3, fibras insolubles y solubles, arroz de levadura roja; Strum, Faloon, 2005). Esta lista no pretende ser limitante, sino ejemplificar el efecto de los agentes reductores del colesterol sobre la restricción de la infección por *Chlamydia*. Recientemente, se han publicado ampliamente otros ejemplos no limitantes de agentes reductores del colesterol, reductores de lípidos y de apoyo cardiovascular (English, 2005; Granato, 2003 y 2005; Myers, 2006; Naguib, 2004; Srejjic, 2006).

Este estudio muestra que cualquier agente que restrinja el colesterol/lípidos restringe también la infección/crecimiento de *Chlamydia*. En otras palabras, cualquier agente que restrinja el colesterol restringe *Chlamydia*.

Ejemplo 8

Se usaron en este estudio los procedimientos del ejemplo 1. Las células cancerosas no tratadas mostraron evidencia de una inclusión sólida grande ($>20 \mu\text{m}$; Figura 7B) en comparación con las inclusiones de tamaño intermedio ($20 \mu\text{m}$) en macrófagos de murino no cancerosos (Figura 4B) e inclusiones aún menores en células tratadas con tocotrienol, tanto macrófagos de murino (Figura 4A) como células de tumor mamario ($10\text{-}15 \mu\text{m}$; Figura 7A).

El contenido de colesterol de las células cancerosas es muy alto debido a que la enzima HMG-CoA reductasa limitante de la velocidad para la síntesis de colesterol en estas células está aberrantemente elevada y la enzima es resistente a la regulación por retroalimentación de esterol. Inequívocamente, se ha mostrado que el tocotrienol inhibe la síntesis de reductasa y acelera la degradación de reductasa (Mo y Elson, 2004).

Puesto que las células cancerosas son ricas en contenido de colesterol, son más susceptibles de infección por *Chlamydia* interceptora de colesterol, lo que explica las inclusiones dilatadas en las células.

Los tocotrienoles son conocidos por inducir la apoptosis de células cancerosas. Al contrario de esto, se ha mostrado que *Chlamydia* inhibe la apoptosis de células infectadas. Las células cancerosas infectadas por *Chlamydia* y tratadas con tocotrienol de este ejemplo no parecían volverse apoptóticas. Aunque el tocotrienol no causaba que las células hospedadoras infectadas experimentaran apoptosis, no obstante desestabilizaban el desarrollo de inclusiones totalmente hinchadas por *Chlamydia* infecciosa. Sin embargo, se espera la apoptosis con tocotrienol con el uso continuo (Ejemplo 3), con lo que los CE de *Chlamydia* se eliminan con el tiempo (Ejemplo 1), ya que se ha mostrado numerosas veces que el control de *Chlamydia* es un proceso de control de su progresión (todos los ejemplos anteriores). Este estudio muestra que el tocotrienol detendrá las infecciones oportunistas por *Chlamydia* en pacientes de cáncer.

Ejemplo 9

La infección por *Chlamydia* modulaba la activación de linfocitos T y estaba ligada a una disminución de la población de células dendríticas presentadoras de antígeno en el cuerpo humano. Por lo tanto, se previene que las células dendríticas activen los linfocitos T y disminuye la inmunidad del individuo ante *Chlamydia* y otros patógenos oportunistas. Esto está apoyado adicionalmente por la implicación de *Chlamydia* en la enfermedad autoinmunitaria. El tocotrienol es conocido por estimular el sistema inmunitario para contrarrestar las infecciones víricas y bacterianas, y se ha mostrado incluso que ayuda a los linfocitos T al retardar la progresión del SIDA y aumentar los marcadores inmunitarios específicos. Por tanto, el tocotrienol ayuda también al sistema inmunitario mediante la activación de células dendríticas y linfocitos T para combatir infecciones por *Chlamydia*.

Este estudio muestra que el tocotrienol contrarrestará las infecciones patógenas, incluyendo *Chlamydia*, mediante la activación de células dendríticas presentadoras de antígeno y linfocitos T.

Esta invención se aplica también a la activación de células dendríticas presentadoras de antígeno y linfocitos T frente a tumores y cánceres.

5 Ejemplo 10

El tocotrienol disminuye la hipertensión sanguínea en ratas hipertensas. Las células hipertensas pulmonares primarias (HPP) tienen una expresión potenciada de caveolas, que contribuye a una elevada $[Ca^{2+}]$ asociada a hipertensión, y cuando se trataban con agentes reductores del colesterol tales como estatina, se modificaba la expresión de caveolas en estas células y se reducía la vasoconstricción. Puesto que las células HPP tienen una expresión aumentada de caveolas en las membranas celulares y que la entrada de *Chlamydia* en las células hospedadoras implica balsas lipídicas, los pacientes hipertensos son más susceptibles de infecciones oportunistas por *Chlamydia*. El tocotrienol, como otros agentes reductores de colesterol, disminuye la expresión de caveolas en membranas celulares, regula negativamente la $[Ca^{2+}]$ en células HPP y protege frente a infecciones por *Chlamydia*.

15 Esta invención proporciona la aplicación de que el tocotrienol combate la infección oportunista por *Chlamydia* de pacientes hipertensos, y reduce así su presión sanguínea.

Ejemplo 11

El síndrome metabólico es un agrupamiento de factores de riesgo cardiovasculares, incluyendo circunferencia de cintura elevada, triglicéridos elevados, colesterol de lipoproteína de alta densidad reducido, presión sanguínea elevada y glucosa en ayunas elevada asociada a obesidad, y eleva el riesgo de desarrollar diabetes. *Chlamydia* no es un agente causante de la diabetes, pero las infecciones seroactivas por *Chlamydia* en pacientes diabéticos son más frecuentes que en pacientes no diabéticos, lo que significa que los pacientes diabéticos pueden ser más susceptibles de infección por *Chlamydia*. El tocotrienol reduce el factor de riesgo cardiovascular asociado a síndrome metabólico, obesidad y diabetes, y por lo tanto puede reducir las infecciones oportunistas por *Chlamydia* debidas a estos factores.

25 Esta invención proporciona la aplicación de que el tocotrienol reduce los factores de riesgo cardiovascular asociados a síndrome metabólico, y reduce así el riesgo de diabetes e infección concomitante o posterior por *Chlamydia*.

Ejemplo 12

El modo de aplicación de los tocotrienoles es importante porque *Chlamydia* está implicada en muchas enfermedades relacionadas con la salud pública. Se describe un sumario no limitante de estas enfermedades en la sección de antecedentes. El modo de aplicación del tocotrienol puede ser en forma de pulverizadores en aerosol (para alcanzar las vías aéreas del tracto respiratorio), ingestión oral por cápsulas blandas, comprimidos o cápsulas (para alcanzar los sistemas vascular-orgánicos), cremas, duchas y lociones tópicas (para alcanzar los sitios genitales) y gotas líquidas tópicas (para alcanzar los sitios oculares).

35 Dosificaciones: En una realización, la invención esboza un procedimiento que comprende administrar δ T3 a un intervalo de 10 a 1.000 mg al día. En una realización preferida, la invención esboza un procedimiento que comprende administrar δ T3 a un intervalo de 20 a 500 mg al día. En una realización más preferida, la invención esboza un procedimiento que comprende administrar δ T3 a un intervalo de 50 a 150 mg al día. El tratamiento sería continuo, administrándose el δ T3 diariamente a las dosificaciones anteriormente mencionadas (durante tan poco como un mes, preferiblemente seis meses y lo más preferiblemente un año), o hasta que se resuelva la infección o inflamación debida a *Chlamydia* (p.ej., no pueden encontrarse unidades de formación de inclusión en la sangre completa del paciente). Sin embargo, para la prevención de la infección por *Chlamydia*, la dosificación puede estar en el extremo inferior (p.ej. 1-100 mg/día) y la duración de la dosificación puede ser indefinida, y empezar antes de que el sujeto tenga ninguna evidencia de infección por *Chlamydia*.

45 Para alcanzar las infecciones del tracto respiratorio, el tocotrienol puede usarse en forma de pulverizador en aerosol, a una dosificación de 1-4 pulverizaciones al día a las dosificaciones anteriormente mencionadas. Para infecciones del tracto genital, el tocotrienol puede administrarse en forma de cremas, lociones o duchas tópicas con 1-4 aplicaciones al día a las dosificaciones mencionadas anteriormente. Los sistemas vascular-orgánicos inflamados debido a infección por *Chlamydia* pueden tratarse con ingestión oral de tocotrienol con 1-4 cápsulas blandas, comprimidos o cápsulas a las dosificaciones mencionadas anteriormente. Para tratar infecciones oculares, incluyendo conjuntivitis, puede administrarse tocotrienol en forma de gotas oculares líquidas con 1-4 aplicaciones al día a las dosificaciones mencionadas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra durante al menos 3 días a un mamífero necesitado de tratamiento.
- 5 2. Uso de un tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho medicamento se administra durante al menos 3 días a un mamífero necesitado de tratamiento.
3. El tocotrienol de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el tratamiento inhibe, previene o desestabiliza el desarrollo del ciclo celular e infección de *Chlamydia*.
- 10 4. El tocotrienol de la reivindicación 1 o 3 o el uso de la reivindicación 2 o 3, en el que el tratamiento comprende adicionalmente administrar un geranilgeraniol.
5. El tocotrienol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 4 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho tocotrienol se selecciona del grupo consistente en un tocotrienol natural y un tocotrienol sintético.
- 15 6. El tocotrienol o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho tocotrienol se selecciona del grupo consistente en tocotrienol α , tocotrienol β , tocotrienol γ , tocotrienol δ , desmetiltocotrienol y didesmetiltocotrienol.
7. El tocotrienol o el uso de la reivindicación 6, en el que dicho tocotrienol es tocotrienol δ .
8. El tocotrienol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la *Chlamydia* se selecciona del grupo consistente en *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydiophila pneumoniae*, *Chlamydiophila psittaci*, *Chlamydiophila pecorum*, *Chlamydiophila abortis*, *Chlamydiophila felis* y *Chlamydiophila caviae*.
- 20 9. El tocotrienol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el tocotrienol dificulta el crecimiento e inhibe la maduración de *Chlamydia* desde cuerpos reticulados hasta cuerpos elementales, previniendo su progresión y desarrollo.
- 25 10. El tocotrienol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el tocotrienol reduce la infección por *Chlamydia* de un leucocito.
11. El tocotrienol o el uso de la reivindicación 10, en el que el leucocito se selecciona del grupo consistente en neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.
12. El tocotrienol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 11 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el modo de aplicación del tocotrienol se selecciona del grupo consistente en pulverizador en aerosol, ingestión oral, cremas, duchas, lociones y gotas oculares.
- 30 13. El tocotrienol o el uso de la reivindicación 12, que comprende administrar una dosis de tocotrienol de entre 20 y 500 mg al día, o de entre 50 y 150 mg al día.
14. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω 3, una lecitina, ajo, guggulípidos, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura roja y un mineral.
- 35 15. Uso de tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo consistente en una estatina, un bioflavonoide, un polifenol, una flavona polimetoxilada, un esteroles vegetal, un orizanol, un policosanol, una vitamina B, CoQ10, un ácido graso ω 3, una lecitina, ajo, guggulípidos, una fibra insoluble, una fibra soluble, una proteína de soja, un quitosano, un arroz de levadura roja y un mineral.
- 40 16. El tocotrienol de la reivindicación 14 o el uso de la reivindicación 15, en el que el agente es un bioflavonoide cítrico.
- 45 17. Un tocotrienol para uso en el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que el tocotrienol se administra durante al menos 3 días a un mamífero o ave, en el que dicho mamífero o ave padece una enfermedad asociada a *Chlamydia* seleccionada del grupo consistente en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual, infección del tracto genital, artritis, prediabetes, síndrome metabólico, diabetes, síndrome del ovario poliquístico (SOP), infección del tracto respiratorio, neumonía, infección ocular, enfermedad neurológica, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- 50

18. Uso de tocotrienol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Chlamydia*, en el que el tocotrienol se administra durante al menos 3 días a un mamífero o ave, en el que dicho mamífero o ave padece una enfermedad asociada a *Chlamydia* seleccionada del grupo consistente en enfermedad cardiovascular, hipertensión, aterosclerosis, inflamación inducida por COX-I y COX-II, enfermedad de transmisión sexual, infección del tracto genital, artritis, prediabetes, síndrome metabólico, diabetes, síndrome del ovario poliquístico (SOP), infección del tracto respiratorio, neumonía, infección ocular, enfermedad neurológica, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- 5 19. Un tocotrienol para uso en la mejora de la inmunidad ante *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol potencia una célula dendrítica presentadora de antígeno.
- 10 20. Uso de tocotrienol para la fabricación de un medicamento para mejorar la inmunidad ante *Chlamydia*, en el que dicho tocotrienol potencia una célula dendrítica presentadora de antígeno.

Figura 1

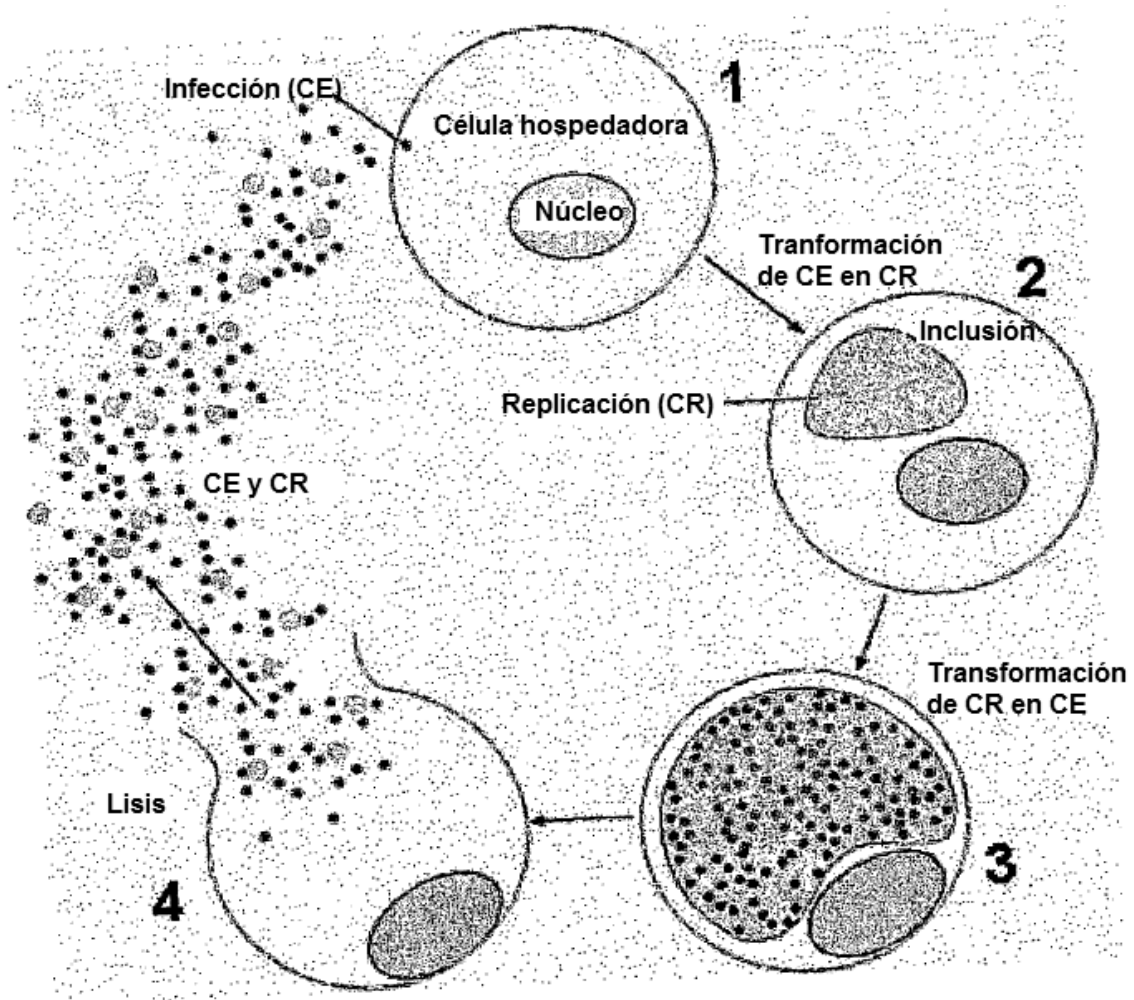
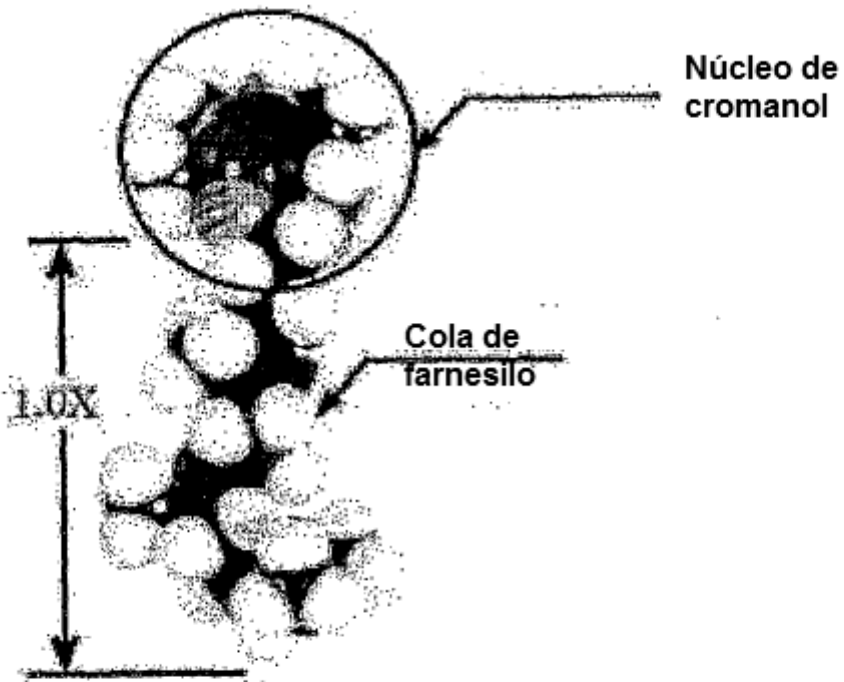


Figura 2



Tacotrienol (T3)

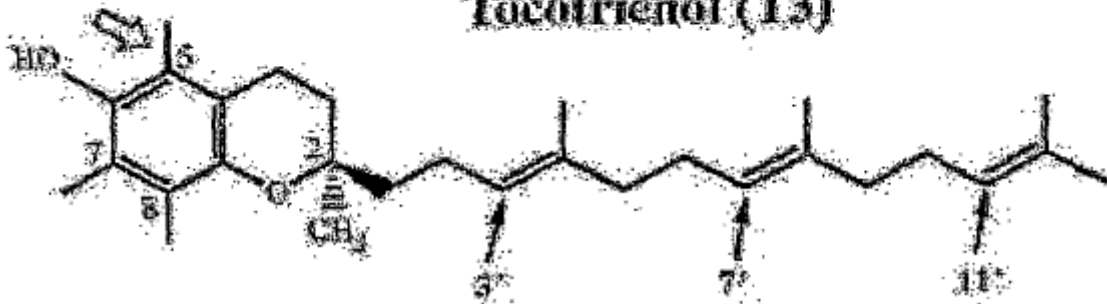


Figura 3

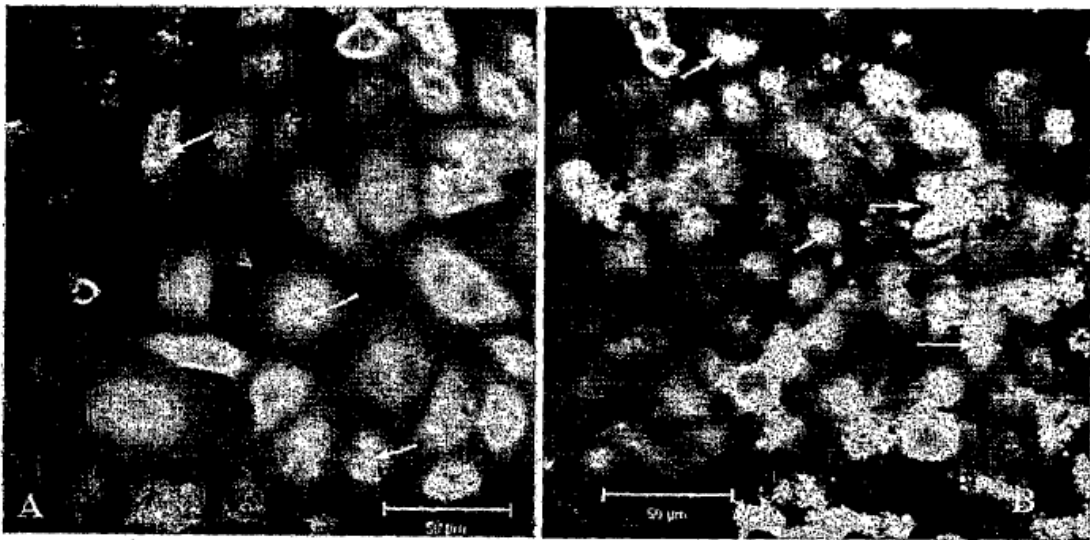


Figura 4



Figura 5

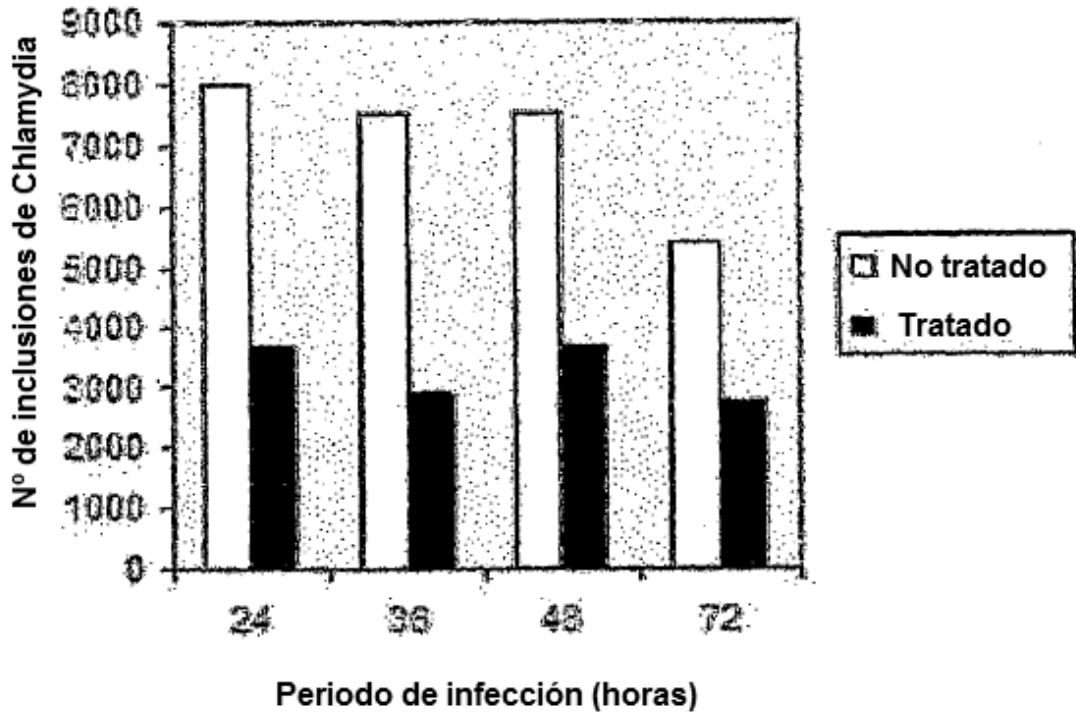


Figura 6

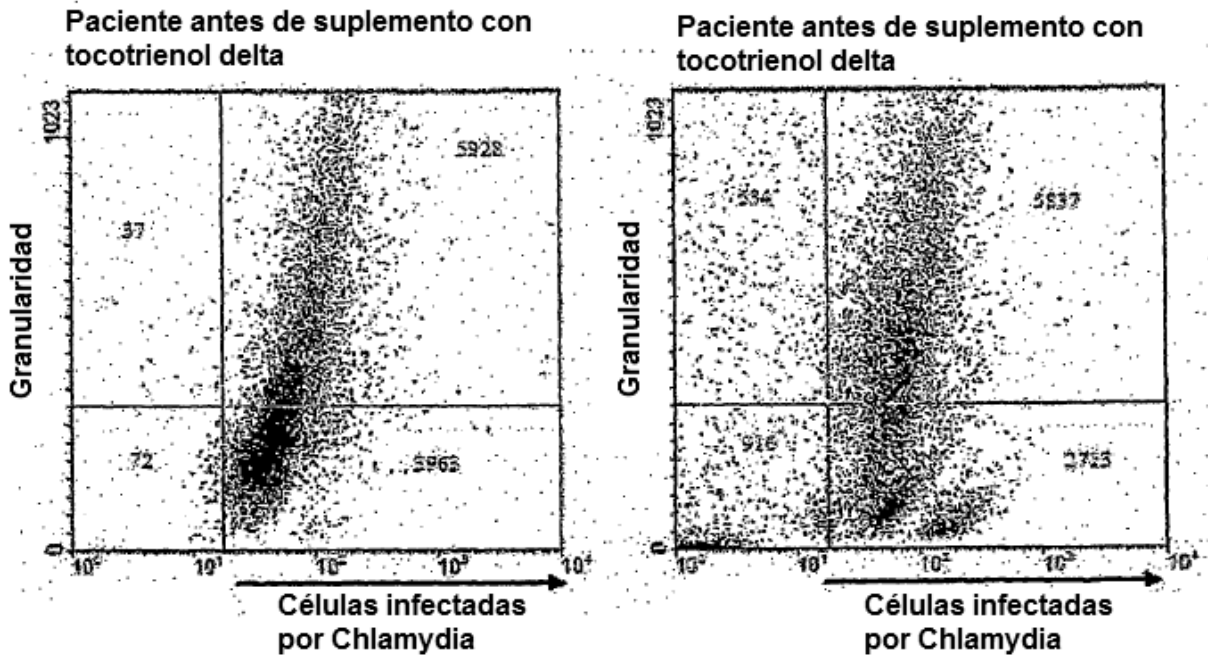


Figura 7

