

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 843**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2011 E 11831629 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2624863**

54 Título: **Terapias probióticas para el autismo**

30 Prioridad:

07.04.2011 US 201161472963 P
07.10.2010 US 391004 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.09.2016

73 Titular/es:

CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
1200 East California Boulevard M/C 6-32
Pasadena, CA 91125, US

72 Inventor/es:

MAZMANIAN, SARKIS K.;
PATTERSON, PAUL H.;
CHOW, JANET;
HSIAO, ELAINE y
MCBRIDE, SARA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 843 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

Terapias probióticas para el autismo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones probióticas y a base de probióticos y a un procedimiento de uso de las mismas.

Más en particular, se refiere al uso de *Bacteroides fragilis* o bacterias relacionadas para mejorar el comportamiento mental de individuos que sufren autismo, trastornos del espectro autista (TEA) y/o afecciones con síntomas relacionados tales como ansiedad.

Antecedentes de la invención

10 Los trastornos del espectro autista (TEA) son discapacidades del neurodesarrollo complejas caracterizadas por comportamientos repetitivos/estereotípicos y déficits en la comunicación e interacción social. Recientes estudios subrayaron la notable alteración en la regulación inmunitaria neuronal y periférica en individuos autistas. Por otro lado, un subgrupo significativo de niños con TEA presenta complicaciones gastrointestinales (GI), incluyendo mayor permeabilidad intestinal y composición alterada de la flora intestinal. Además, se ha descrito que el tratamiento
15 antibiótico y las dietas restrictivas mejoran los síntomas del comportamiento en algunos niños con TEA (revisado por Buie et al., 2010).

Breve resumen de la invención

20 En una realización, se proporciona un procedimiento para mejorar el desempeño del comportamiento en un individuo que comprende, identificar un individuo que necesita tratamiento, y proporcionar a dicho individuo una composición que comprende bacterias del género *Bacteroides*, por lo que el individuo muestra un desempeño del comportamiento mejorado.

En una realización de párrafo [0005], el individuo que necesita tratamiento sufre de ansiedad, autismo, TEA o una afección mental con alguno de los síntomas de TEA.

La bacteria está seleccionada de un grupo que consiste en *B.fragilis*, *B. theta* y *B.vulgatus*.

25 En otra realización, se proporciona una composición probiótica para mejorar el desempeño del comportamiento que comprende bacterias del género *Bacteroides*, por lo que el individuo muestra un desempeño del comportamiento mejorado.

30 Aun en otra realización, se proporciona un nutraceutico para mejorar el desempeño del comportamiento de individuos que comprende bacterias del género *Bacteroides*, por lo que el individuo muestra un desempeño del comportamiento mejorado.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende bacterias del género *Bacteroides*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo cual la composición mejora el desempeño del comportamiento.

35 En otra realización del párrafo [0011], la composición farmacéutica comprende además otro medicamento o compuesto usado para tratar el desempeño del comportamiento, donde el medicamento o compuesto no comprenden ninguna otra bacteria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que las crías con MIA presentan elevada ansiedad en la prueba de campo abierto y que esta puede aliviarse mediante el tratamiento con probióticos. Se administraron *B. fragilis* u otras especies de bacterias en el alimento durante 1 semana después del destete (el destete se produjo a las 3 semanas de edad).

40 La Figura 2 muestra evidencia histológica de que las crías con MIA adultas presentaron mayor infiltración de células inflamatorias de sus colonos. El recuadro muestra una vista aumentada de un agregado de células inflamatorias.

45 La Figura 3 muestra niveles de IL-17 elevados en linfocitos de crías con MIA. En este caso, se indujo MIA en hembras de ratón preñadas mediante tratamiento con poly(I:C) (ácido policitídilico) o una inyección única de IL-6 recombinante. La citocina IL-6 ha mostrado previamente que induce los mismos síntomas del tipo TEA en las crías resultantes que la inyección materna de poly(I:C) (Smith et al., 2007).

50 La Figura 4 muestra que las crías con MIA presentan elevados niveles de comportamiento estereotipado/repetitivo en las pruebas de enterramiento de esferas, y que estos pueden normalizarse por tratamiento con probióticos con ciertas bacterias. Las crías adultas de madres a las que se inyectó solución salina y poly(I:C) se probaron para determinar el porcentaje de esferas enterradas en un período de 10 minutos. La colonización con especies *B. fragilis* y relacionadas en el destete previene el desarrollo de comportamientos repetitivos y compulsivos comparados con

las crías con MIA sin el probiótico. Prueba t de Student: *p<0,05 **p<0,01. n= 14-20 animales por ensayo.

La Figura 5 muestra el grado de filtración de una sonda de dextrano en la circulación de crías con MIA a las que se administró uno de varios tipos de especies de bacterias. Lo más importante es el hallazgo de que MIA presenta un "intestino permeable" y que *B. fragilis* y las otras especies *Bacteriodes* probadas pueden evitar este trastorno.

5 **Descripción detallada de la invención**

El término "dosis eficaz" es una cantidad que da como resultado una reducción, inhibición o prevención del trastorno/anomalías/síntomas del comportamiento en el individuo. La cantidad de *B. fragilis* u otro probiótico requerida para conseguir esto puede determinarse por un experto en la técnica.

10 El término "individuo" tal como se usa en el presente documento incluye un único organismo biológico en el que puede producirse inflamación que incluye, aunque sin quedar limitado a animales y en particular animales superiores y en particular vertebrados tales como mamíferos y en particular seres humanos.

15 El término "afección/trastorno/síntoma" o "anomalía del comportamiento" como se usa en el presente documento se refiere a síntomas expresados por un individuo con un trastorno mental, tal como aunque sin quedar limitado a ansiedad, autismo, trastornos del espectro autista, síndrome de X Frágil, síndrome de Rett, esclerosis tuberosa, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de déficit de atención o esquizofrenia. Los síntomas anteriormente citados son algunos de los presentados por las crías con MIA.

20 El término "individuo que necesita el tratamiento" se refiere a una persona que expresa o padece de uno o más de los trastornos/síntomas del comportamiento citados antes. Una persona apropiadamente cualificada puede identificar tal individuo que necesita tratamiento usando protocolos/pautas de prueba de comportamiento convencionales. Los mismos protocolos/pautas de prueba de comportamiento pueden usarse también para determinar si se produce mejora en los trastornos/síntomas de los individuos; y determinar la dosis más eficaz de células de *B. fragilis* para administrar a un individuo que necesita el tratamiento.

25 El término "mejora en el desempeño del comportamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la prevención o reducción en la intensidad o frecuencia, en cualquier grado, de uno o más de los trastornos/síntomas/anomalías del comportamiento anteriores expresados por el individuo. La mejora se observa bien por los propios individuos que toman el tratamiento o por otra persona (médico o cualquier otra).

30 El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento indica cualquier actividad que es parte de un cuidado aprobado por un médico (prescrito por el facultativo) o por una persona que no es médico (es decir, sin prescripción incluyendo pero sin limitarse a vitaminas, hierbas; suplementos; probióticos, etc.) que trate una afección/síntoma como los descritos antes.

35 El término "prevención" tal como se usa en el presente documento indica cualquier actividad que reduce la carga del individuo después de expresar estos síntomas del comportamiento. Esto tiene lugar en los niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria, donde: a) la prevención primaria evita el desarrollo de los síntomas/trastorno/afección; b) las actividades de prevención secundaria están destinadas a las primeras etapas del tratamiento de la afección/trastorno/síntoma, por lo que aumentan las oportunidades de intervenciones para evitar la progresión de afección/trastorno/síntoma y la aparición de los síntomas; y c) la prevención terciaria reduce el impacto negativo de una afección/trastorno/síntoma ya establecidos restaurando la función y reduciendo cualquier afección/trastorno/síntoma o complicaciones relacionadas.

40 Vehículos farmacéuticamente aceptables o apropiados pueden ser, aunque sin quedar limitados a los mismos, excipientes orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos que sean adecuados para el modo seleccionado de aplicación tal como aplicación oral o inyección, y administrarse en la forma de una preparación farmacéutica convencional. Tal preparación incluye sólida tal como comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas y líquida tal como solución, emulsión, suspensión y similares. Dicho vehículo incluye almidón, lactosa, glucosa, sacarosa, dextrina, celulosa, parafina, glicéridos de ácidos grasos, agua, alcohol, goma arábiga y similares. Si fuera necesario, pueden añadirse auxiliares, estabilizadores, emulsionantes, lubricantes, aglutinantes, controladores para ajustar el pH, agentes de isotonicidad y otros aditivos convencionales.

45 Los vehículos farmacéuticamente aceptables o apropiados pueden incluir también otros compuestos conocidos por ser beneficiosos para una situación alterada del tracto GI (por ejemplo, antioxidantes, tales como vitamina C, vitamina E, selenio o cinc); o una composición de alimento. La composición de alimento puede ser, aunque sin quedar limitada a los mismos, leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, helados, productos a base de cereal fermentado, polvos a base de leche, fórmulas para lactantes, comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales secos o suplementos orales húmedos.

50 El término "nutracéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material alimentario (como un alimento fortificado o un suplemento de la dieta) que proporciona beneficios para la salud. Los alimentos nutracéuticos no están sujetos a las mismas pruebas y regulaciones que los medicamentos farmacéuticos.

55

- 5 El término “probiótico” tal como se usa en el presente documento se refiere a microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al hospedador. Los probióticos pueden estar disponibles en alimentos y en suplementos para la dieta (por ejemplo, aunque sin quedar limitados a los mismos, cápsulas, comprimidos y polvos). Ejemplos de alimentos que contienen probióticos son yogur, leche fermentada y sin fermentar, miso, tempeh y algunos zumos y bebidas de soja.
- 10 El término “extracto” tal como se usa en el presente documento indica el material insoluble o material soluble obtenido de *B. fragilis* o especies relacionadas usando diversos procedimientos químicos, inmunológicos, bioquímicos o físicos por los expertos en la técnica, incluyendo, aunque sin quedar limitados a los mismos, precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía en columna y lisis con detergente.
- 15 El término “lisado de células completas” se refiere a la fracción obtenida cuando *B. fragilis* o especies relacionadas son lisadas usando detergente u otros medios químicos o físicos. El término “nativo” cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras, células/cepas bacterianas y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre.
- 20 El término “aislado” cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras, células/cepas bacterianas y similares, se refiere a los materiales antes citados aislados o purificados, cuando estos materiales no se presenten de forma natural y/o cuando estos posean características notablemente diferente o distintivas comparados con los encontrados en el material nativo.
- 25 El término “no desnaturalizado” cuando se usa en el presente documento se refiere a que la bacteria se congela en un medio y luego sufre un proceso de secado por congelación. Tal bacteria no desnaturalizada puede mezclarse con otras sustancias/compuestos/vehículos/aditivos y administrarse en forma de pastilla, comprimido o líquido a individuos que necesitan una mejora del comportamiento. Las bacterias no desnaturalizadas también pueden mezclarse en alimentos (galletas, yogur, leche, etc.).
- El término “medicamentos o compuestos convencionales” tal como se usa en el presente documento en el contexto de “otros medicamentos o compuestos convencionales usados para tratar trastornos/síntomas del comportamiento se refiere a aquellos medicamentos o compuestos que los expertos en la técnica (incluyendo aunque sin quedar limitados a los médicos) usan de forma convencional para tratar las afecciones/trastornos/síntomas antes citados” o la “anomalía del comportamiento”.
- 30 El término “relacionado” tal como se usa en el presente documento en el contexto de “*B. fragilis* y especies relacionadas” se refiere a las otras especies del género *Bacteroides* (o cualquier otra), que mostraron tener efectos positivos sobre comportamientos tales como los probados aquí.
- 35 El laboratorio Patterson desarrolló un modelo de ratón que tiene validez tanto en creación como facial para el autismo, MIA (Activación Inmune Materna) (revisado en Patterson, 2011). Este se basa en la evidencia epidemiológica de que la infección viral o bacteriana durante el embarazo aumenta el riesgo de TEA en las crías (Atladdottir et al., 2010). En este modelo animal, hembras de ratón embarazadas que recibieron una infección respiratoria a la mitad de la gestación, o que recibieron la emulación viral de ARN de doble cadena, poly(I:C), producen crías con una serie de comportamientos anómalos, incluyendo los síntomas característicos de comportamientos repetitivos/compulsivos, y déficits en la interacción y comunicación social (Patterson, 2011). Además, las crías con MIA presentan una neuropatología específica que es común en el TEA, déficits especialmente restrictivos en células de Purkinje (Patterson, 2011). Recientemente, la colaboración entre los laboratorios de Sarkis Mazmanian y Paul Patterson ha descubierto que las crías con MIA presentan anomalías en el sistema inmunitario y en el tracto gastrointestinal. Lo más importante, algunos de los síntomas del comportamiento del tipo TEA pueden corregirse o prevenirse manipulando la flora intestinal de las crías con MIA. Este tratamiento se basa en el trabajo previo del grupo de Mazmanian que muestra la eficacia del tratamiento con *B. fragilis* en varios trastornos del GI e inflamatorios sistémicos (Round et al., 2009, 2010).
- 45

Experimento 1. La colonización con *B. fragilis* reduce la ansiedad tanto en las crías con MIA como en controles

- 50 La prueba en campo abierto es una prueba de la ansiedad bajo condiciones leves de estrés, y sujetos con TEA presentan una ansiedad mejorada bajo tales circunstancias. Las crías se prueban en campo abierto para determinar los efectos de *B. fragilis* y una serie de otras especies de bacterias sobre el comportamiento de la ansiedad. Se tratan grupos de ratones hembra embarazadas (n>3) en E12.5 con poly(I:C) para inducir MIA, o solución salina como control (Smith et al., 2007). Inmediatamente después del destete, se colonizan las crías con una de las bacterias mostradas (administrada en el alimento) o no, durante una semana. Se colocan los ratones en una caja abierta con luz brillante, y se registra la actividad por una cámara de video y se analiza usando el software Ethovision (Noldus). Se miden el número de entradas al, y el tiempo que pasan en el, centro de la arena. Como era
- 55 de esperar, las crías con MIA pasan menos tiempo en el centro del campo abierto y entran menos frecuentemente que las crías control, indicando una mayor ansiedad (Fig. 1). El tratamiento con *B. fragilis* y otras especies de *Bacteroides* previene el comportamiento anómalo en las crías con MIA, indicando que el tratamiento con probióticos reduce la ansiedad en animales normales así como en ratones con el modelo de TEA. Por el contrario, la especie no

Bacteroides, *E. faecalis*, no es capaz de prevenir la ansiedad en las crías con MIA. Así, existe especificidad entre las especies de bacterias probadas (las diferencias citadas son significativas a $p < 0,05$ y $0,01$).

2. El tracto GI de las crías con MIA presenta patología

5 Se prepararon los colonos de crías adultas con MIA y control para histología y se tiñeron con H & E. Como se ilustra en la Fig. 2, existe una infiltración celular significativa en las crías con MIA. Esto se apreció en 4 de 5 ratones con MIA en los que se experimentó. Por el contrario, este tipo de infiltración se apreció solo en 1 de 5 ratones control. La identidad de las células que se infiltran en el colon se está examinando.

3. Linfocitos en ganglios linfáticos mesentéricos asociados al tracto GI de crías de madres con MIA presentan elevada liberación de citocinas después de estimulación.

10 Para valorar el estado de activación de linfocitos asociado con el tracto GI, se diseccionaron ganglios linfáticos mesentéricos de crías adultas de madres control, crías de madres con MIA tratadas con poly(I:C), y crías de madres con MIA tratadas con IL-6. Se aislaron células CD4+ y se trataron en cultivo con PMA y ionomicina. Los líquidos sobrenadantes se ensayaron para determinar IL-6 (no mostrada) e IL-17 (Fig. 3). En ambos días ensayados, los linfocitos de las crías con MIA presentan una mayor liberación de citocinas que los controles.

4. Prueba de enterramiento de esferas

15 Una de las pruebas usadas para ensayar el comportamiento repetitivo/compulsivo estereotipado en roedores es el enterramiento de esferas. Se colocan los animales en una jaula con una serie de esferas dispuestas en la parte superior del lecho. Se mide el número de esferas enterradas en un período determinado para cuantificar este comportamiento repetitivo. Los autores han encontrado que las crías con MIA entierran muchas más esferas que los controles (Fig. 4 solución salina frente a poly(I:C)). Cabe destacar, que las crías con MIA tratadas con *B. fragilis* u otra especie *Bacteroides* no presentan este síntoma tipo TEA (Fig. 4). Además, como en la prueba en campo abierto, el tratamiento con la especie no *Bacteroides*, *E. faecalis*, no previene la ansiedad en las crías con MIA. (Las diferencias citadas son significativas a $p < 0,05$).

5. Restauración de la función de barrera epitelial

25 Puesto que la especie *Bacteroides* puede prevenir anomalías del comportamiento del tipo TEA en crías con MIA, y estas crías presentan patología GI, fue de interés preguntarse si los probióticos también previenen síntomas GI. Puede probarse la función de barrera epitelial GI alimentando al ratón mediante sonda gástrica con un dextrano marcado que es suficientemente grande para que no se filtre normalmente a través de la barrera en cantidades significativas. Cuando la función de barrera está comprometida como por una alimentación por sonda gástrica con sulfato sódico de dextrano (DSS), la sonda de dextrano marcada se filtra a la circulación (Fig. 5). Este es el control positivo para "intestino permeable", un síntoma encontrado en un subgrupo grande de niños con TEA.

30 De importancia es que las crías con MIA adultas también mostraron niveles muy significativos de intestino permeable, y esto puede prevenirse mediante el tratamiento después del destete con todas las especies de *Bacteroides* probadas, pero no con la especie no *Bacteroides*, *E. faecalis*, (Fig. 5). Así, la eficacia del tratamiento con probióticos en el tracto GI corresponde con la especificidad del tratamiento para el comportamiento.

35 Dados los resultados anteriores, las similitudes entre el modelo de MIA y los respectivos trastornos humanos (incluyendo síntomas del comportamiento cardinales de TEA y características neuropatológicas de TEA, y características del comportamiento y neuropatológicas de esquizofrenia, que comparten ambas el factor de riesgo de infección maternal; revisado en Patterson, 2011), podríamos esperar que a individuos que necesitan tratamiento podría administrarse *B. fragilis* o bacterias relacionadas en una cápsula, pastilla, nutraceutico u otra forma probiótica, y el individuo mostraría signos de desempeño del comportamiento mejorado. La dosis eficaz para dicho individuo podría determinarse fácilmente por el propio individuo que se somete a tratamiento o por otro individuo. Por ejemplo, los propios individuos podrían determinar si sus síntomas de ansiedad mejoraron tras la toma de la cantidad apropiada de probiótico. Los individuos que necesitan dicho tratamiento podrían tomar el probiótico cuando lo necesitan o antes del momento en que ellos esperan que podría producirse una aparición de anomalía del comportamiento, cuando el individuo cree que el próximo día podría ser estresante.

Se citan las siguientes referencias:

40 Atladottir, H.O., Thorsen, P., Ostergaard, L., Schendel, D.E., Lemcke, S., Abdallah, M., Parner, E.T. 2010. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Devel Dis* 40:1423-1430.

55 Buie, T., D. B. Campbell, G. J. Fuchs, 3rd, G. T. Furuta, J. Levy, J. Vandewater, A. H. Whitaker, D. Atkins, M. L. Bauman, A. L. Beaudet, E. G. Carr, M. D. Gershon, S. L. Hyman, P. Jirapinyo, H. Jyonouchi, K. Kooros, R. Kushak, P. Levitt, S. E. Levy, J. D. Lewis, K. F. Murray, M. R. Natowicz, A. Sabra, B. K. Wershil, S. C. Weston, L. Zeltzer, and H. Winter. 2010. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics* 125 Suppl 1:S1.

Patterson, P. H. 2011. Modeling features of autism in animals. *Pediatric Res* 69:34R-40R.

Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:313.

5 Round, J. L., R. M. O'Connell, and S. K. Mazmanian. 2010. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *J Autoimmun* 34:J220.

Smith, S. E., J. Li, K. Garbett, K. Mimics, and P. H. Patterson. 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 27:10695.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una única especie de bacteria para su uso en el tratamiento de un individuo que padece ansiedad, autismo, trastornos del espectro autista, una afección mental con algunos síntomas de trastornos del espectro autista, síndrome de X Frágil, síndrome de Rett, esclerosis tuberosa, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de déficit de atención o esquizofrenia, mediante el cual el individuo muestra un desempeño del comportamiento mejorado, en la que la especie de bacteria es *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* o *B. vulgatus*.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el desempeño del comportamiento mejorado se determina por pruebas de comportamiento convencionales.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición probiótica.
4. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición nutracéutica.
5. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el individuo sufre de trastornos del espectro autista.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la especie de bacteria es *B. fragilis*.
8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el individuo presenta intestino permeable.
- 20 9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el desempeño del comportamiento mejorado comprende nivel reducido de ansiedad.
10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el desempeño del comportamiento mejorado comprende un nivel reducido de comportamiento repetitivo.

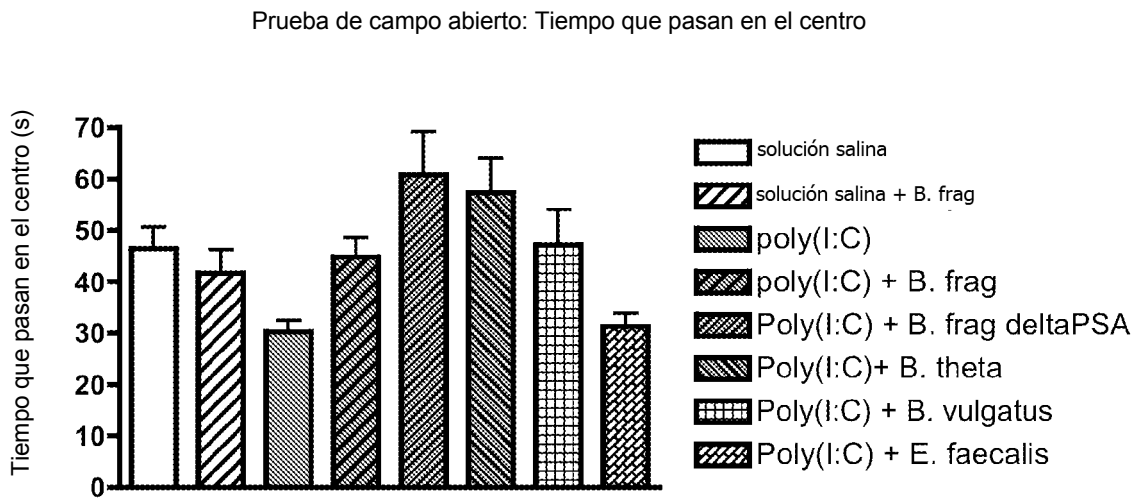
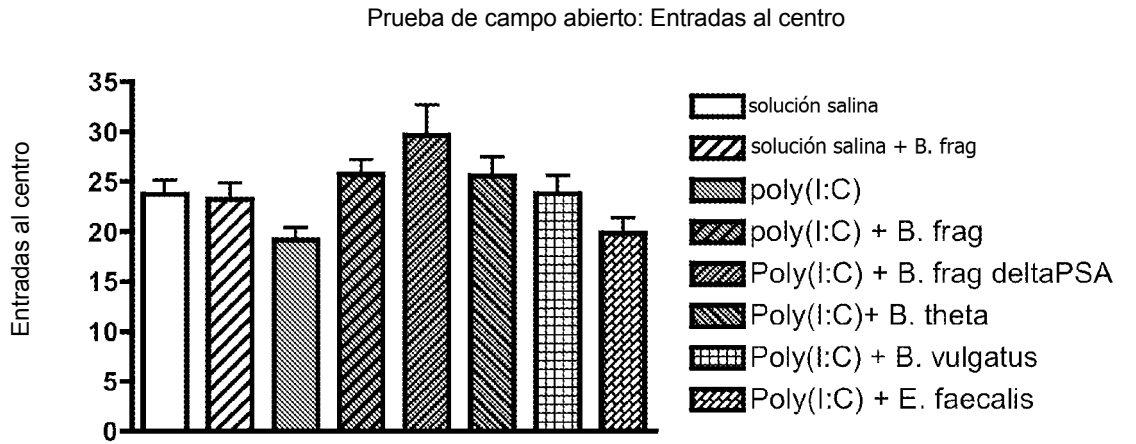


Figura 1

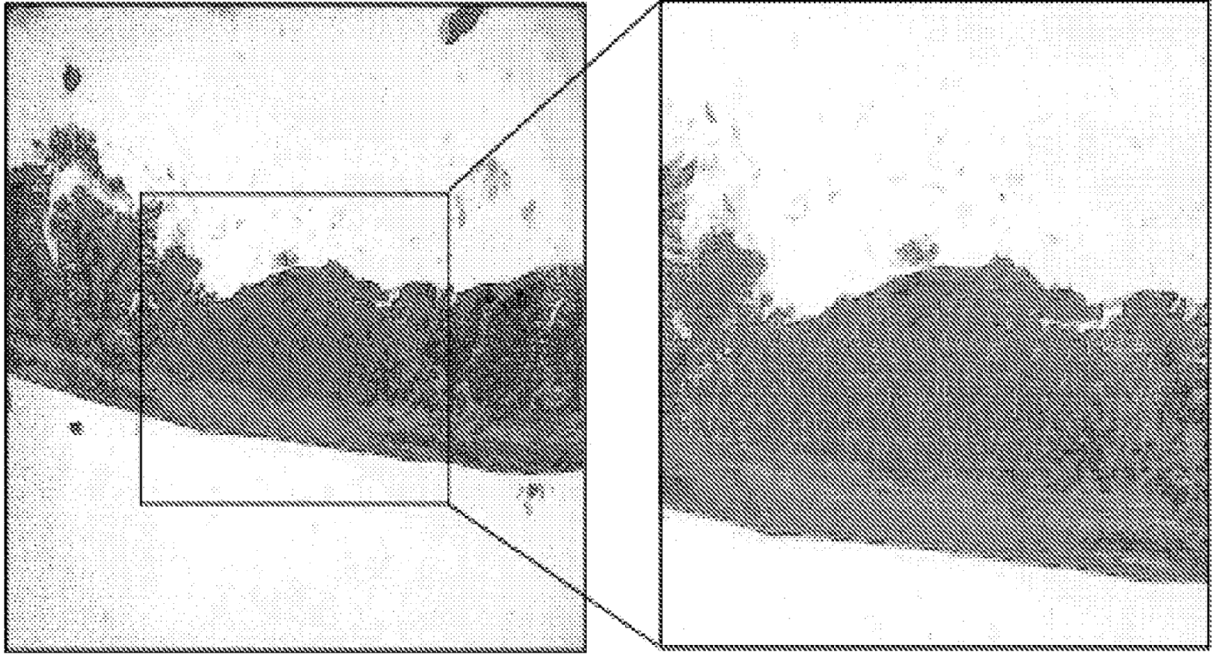


Figura 2

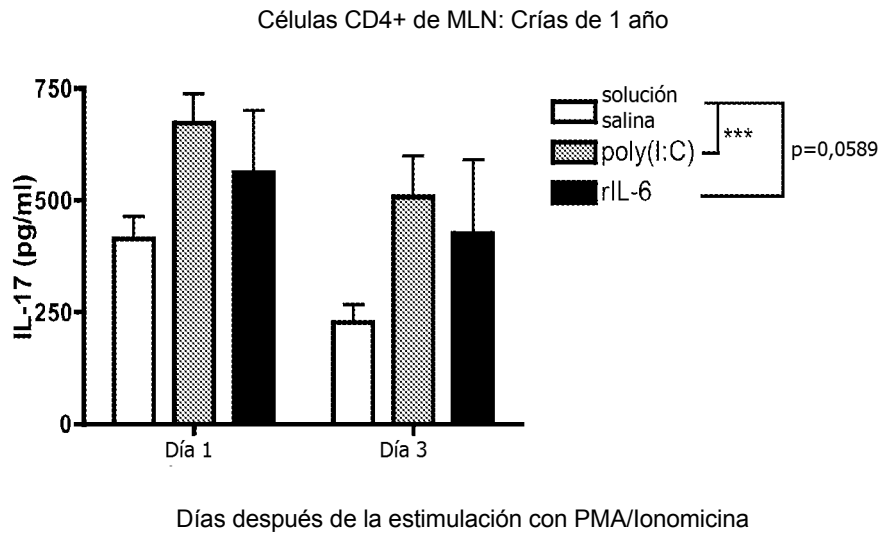


Figura 3

Prueba de enterramiento de esferas

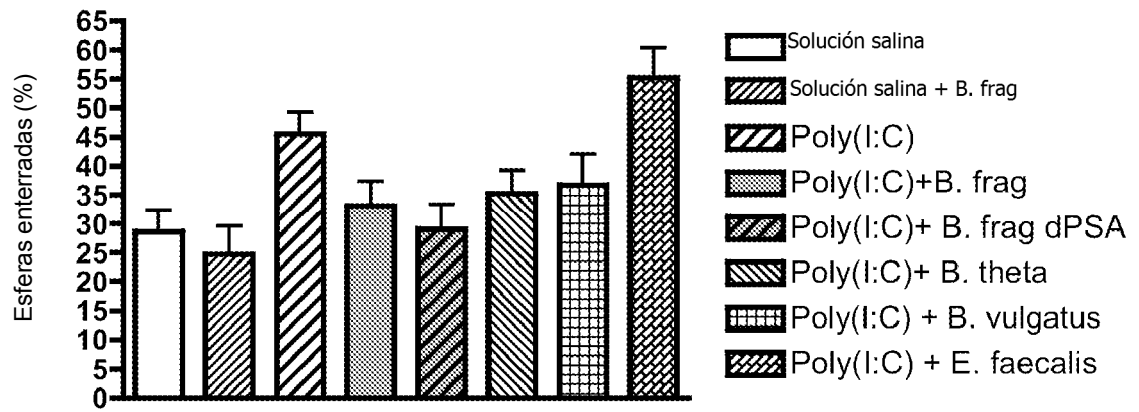


Figura 4

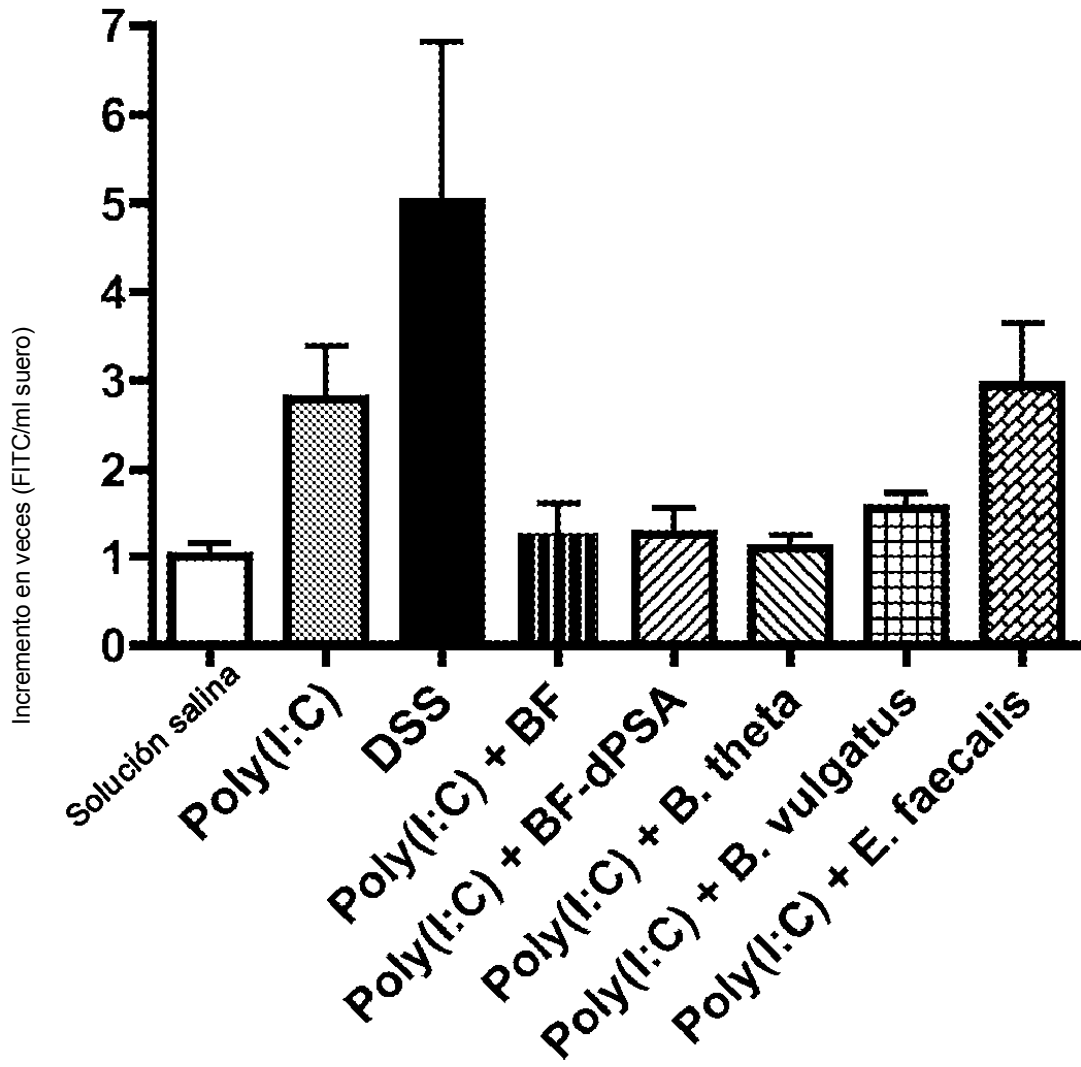


Figura 5