

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 511**

51 Int. Cl.:

A61B 5/04 (2006.01)

A01K 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/EP2012/051317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12705079 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2806788**

54 Título: **Sistema para detectar el nivel de estrés / malestar de animales acuáticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2016

73 Titular/es:
**FUNDACIÓN AZTI/AZTI FUNDAZIOA (100.0%)
Isla de Txatxarramendi s/n
48395 Sukarrieta (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:
**GARCÍA, GONZALO A. y
RAINIERI, SANDRA**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 511 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

Sistema para detectar el nivel de estrés / malestar de animales acuáticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un sistema para la vigilancia biológica; es decir, para detectar el nivel de estrés o malestar que los animales acuáticos como peces o ranas sufren mientras se llevan a cabo estudios experimentales con ellos y también durante sus condiciones de vida normales mientras se mantienen en depósitos de laboratorio, en casas particulares como hobby, en restaurantes para la exhibición de animales acuáticos como peces o marisco a los clientes, en centros de acuicultura para la producción de peces, etc. En particular, el sistema es del tipo que comprende un depósito de agua y una serie de electrodos utilizados para el registro de señales electromiográficas (EMG) y otras señales biológicas producidas por la actividad de los animales acuáticos presentes en el depósito.

Estado de la técnica

15 Los animales acuáticos como peces y ranas son modelos de animales ampliamente conocidos que se utilizan ampliamente en medicina (para el estudio de enfermedades), farmacología (para probar nuevos medicamentos), ecotoxicología (para probar las respuestas de vertebrados a los contaminantes), etc. Los resultados de los experimentos in vivo llevados a cabo con animales acuáticos pueden verse afectados por varios factores. El estrés juega el papel más importante en este sentido. Fertilidad y respuesta al tratamiento, por ejemplo, se ven afectadas en gran medida por las condiciones de estrés. Por lo tanto, se necesita una medida racional, cuantitativa del nivel de estrés durante la experimentación basada en animales acuáticos. Hacer caso omiso de este factor podría conducir a la mala interpretación de los resultados finales de los experimentos in vivo.

20 El uso de señales biológicas para la detección de la actividad motora de los animales acuáticos se ha aplicado en dispositivos dirigidos a la utilización de animales acuáticos como sensores ecotoxicológicos para la determinación de la calidad del agua. El dispositivo descrito en la patente US5307052, convierte el comportamiento ventilatorio de los peces en una señal y considera la señal una determinación instantánea y directa de la calidad del agua que se está probando. El sistema se basa en la amplificación, filtrado y elaboración de señales eléctricas obtenidas de peces colocados individualmente en una serie de depósitos de agua de un tamaño similar a la de los peces, que contiene el agua para ser probada y dos electrodos colocados en el interior del depósito para adquirir las señales.

25 El dispositivo descrito en la solicitud de patente JP2002085362 mide las bio-potenciales (*es decir*, señales eléctricas de origen biológico) de los organismos acuáticos a través de electrodos colocados en el centro del depósito de agua. En esta solicitud, los autores reivindican que el dispositivo puede medir bio-potenciales de los organismos acuáticos en sus condiciones de vida.

30 En los dos casos antes mencionados (US5307052 y JP2002085362), los electrodos se colocan en el centro del depósito de agua y esto interfiere con el libre movimiento de los animales, alterando así sus condiciones de vida y patrones de movimiento normales. Por otra parte, las señales producidas se pueden detectar solo si el animal se coloca en el espacio entre los dos electrodos. Estando estos colocados en el centro del depósito es obvio que si el animal se mueve en una parte del depósito no incluida entre los electrodos, no se detecta ninguna señal. En otras palabras, los sistemas antes mencionados no permiten el seguimiento de las señales producidas por los animales en sus condiciones de vida normales, con la excepción de cuando se encuentran entre los dos electrodos.

35 La solicitud de patente WO9944057 describe un dispositivo análogo en el que las bio-potenciales se miden mediante la disposición de una placa de electrodos de referencia en la parte inferior del depósito y una segunda placa de electrodos flotante en la superficie del agua. De esta manera los autores reivindican permitir la movilidad libre de los animales, disminuyendo el estrés de los animales y facilitando la limpieza y el mantenimiento del sistema. El problema que este sistema podría causar se debe al hecho de que una placa de electrodos superficial flotante podría moverse con el movimiento natural del agua y, aunque muy leve, este movimiento distorsionaría la señal detectada producida por los animales. Por otra parte, la presencia de una placa superior que cubre la totalidad de la superficie del depósito de agua bloquea la entrada de la luz que es necesaria para las condiciones normales de vida de los animales acuáticos.

40 En US6273026, los electrodos se colocan en un depósito de agua y se aplica una corriente entre ellos; la variación de la forma de onda proporciona una indicación del comportamiento del animal. A pesar de que esto podría funcionar para pruebas de comportamiento específicas, el sistema no es adecuado para probar el nivel de estrés / bienestar de los animales acuáticos, ya que la aplicación de una corriente a través de los electrodos será fuertemente percibida por los animales y causará condiciones de gran estrés, alterando sus condiciones de vida normales.

45 Entre otras técnicas anteriores relevantes, se incluyen US6393899 B1, JP3657044 B, JP2007-064783 A, JP2010-223590 A, WO2009/089339 A2.

55 Por lo tanto, las soluciones existentes utilizan electrodos que perturban y condicionan negativamente el estado y el comportamiento de los animales acuáticos que están siendo estudiados. Además, los dispositivos de la técnica

anterior están diseñados para las pruebas en animales de uno en uno, mientras que los animales acuáticos son generalmente gregarios y viven en grupos. Además, ninguno de los dispositivos de la técnica anterior tiene en cuenta la mera presencia de agua en la calidad de los registros, el ruido electromagnético de fondo, ni es capaz de distinguirlo de las señales reales.

5 Sumario de la invención

La presente invención resuelve los problemas expuestos anteriormente proporcionando un dispositivo capaz de medir cuantitativamente el nivel de estrés en los animales acuáticos; estableciendo un sistema de medición conjunto y facilitando el desarrollo de una "escala de estrés" específica para ser introducida de forma rutinaria en los experimentos con peces. Esto se consigue mediante:

- 10 ◦ Nuevos tipos de electrodos y disposiciones de electrodos óptimas para la detección de las señales biológicas.
- Filtrado de las señales obtenidas para reducir el nivel de ruido electromagnético en las mismas.
- Medios para el procesamiento y la interpretación de las señales biológicas.

15 La invención se define en la reivindicación independiente 1. La invención comprende un depósito de agua, una serie de electrodos utilizados para el registro de señales electromiográficas (EMG) u otras señales biológicas producidas por la actividad de los animales acuáticos presentes en el depósito, un bio-amplificador para la amplificación de la señal, un micro-procesador y un filtro de paso bajo.

20 Los electrodos de referencia y de señal pueden fabricarse del mismo material, preferiblemente de aluminio, cobre o plata. Los electrodos de registro tienen la forma de placas de circuitos impresos (PCB) diseñadas para cubrir toda la superficie de un lado del depósito. El filtro de paso bajo está configurado para filtrar las señales por encima de 20 Hz.

Breve descripción de los dibujos

25 Para completar la descripción y con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la invención, se proporciona un conjunto de dibujos. Dichos dibujos ilustran un modo de realización preferido de la invención, que no debe interpretarse como una restricción del alcance de la invención, sino solo como un ejemplo de cómo la invención se puede realizar.

La **figura 1** es una representación esquemática del dispositivo de la invención.

La **figura 2** es un diagrama de Bode del agua, que muestra los diferentes niveles de atenuación producida por el agua en función de la frecuencia de la señal.

30 La **figura 3** es un diagrama que muestra solamente ruido (A) y señal + ruido (B) filtrado con un filtro de paso bajo para reducir la amplitud del ruido.

La **figura 4** es un gráfico de la relación señal-ruido para diferentes áreas de los electrodos con señales de diferentes frecuencias.

La **figura 5** es un gráfico que muestra la atenuación progresiva de la señal (ganancia negativa, medida en decibelios) para frecuencias más altas.

35 La **figura 6** es un gráfico que muestra una configuración (A) y un estudio de correlación entre la señal adquirida con el sistema y la registrada en vídeo (B).

Descripción de la invención

40 Con referencia a la figura 1, la invención comprende un electrodo de referencia (2), situado en uno de los lados del depósito de agua (1) de manera que cubra la totalidad de su superficie. Por lado se entiende cualquiera de las paredes del depósito, incluyendo también su parte inferior. Al menos una matriz de electrodos de registro, que adquieren las señales biológicas producidas por los animales, está colocada en al menos uno de los otros lados del depósito. Los electrodos de registro (3a, 3b, ...) están acoplados a un bio-amplificador a través de cables (5). Las señales así amplificadas son enviadas a un micro-procesador que está a cargo del filtrado y la interpretación de las mismas. Los electrodos pueden estar impresos o incrustados en los lados del depósito, o se pueden proporcionar en soportes (también imprimidos o incrustados), o como placas independientes.

◦ Electrodo de referencia

50 Como cualquier sistema electrónico, la presente invención necesita un electrodo para ser usado como referencia de voltaje. Este electrodo se llama electrodo de referencia o de tierra. Cuanto más grande es el electrodo de referencia, se obtendrán las señales más claras y estables. Por lo tanto, la situación ideal es cuando este electrodo es tan grande como uno de los lados del depósito (incluyendo su parte inferior), suponiendo un tipo de depósito cuadrado.

En un tipo circular, el electrodo podría ponerse en su parte inferior o, arqueándolo, ocupando la mitad del cilindro.

Hay dos formas principales de adquirir una señal: monopolar o bipolarmente. En el caso monopolar, la medición se realiza entre un electrodo y un electrodo de referencia. En el caso bipolar, la medición se realiza entre dos electrodos similares (en este caso, también se necesita un electrodo de referencia de todos modos para proporcionar una referencia fija, estable).

La posición de la matriz de electrodos de registro con respecto al electrodo de referencia influye en gran medida en la detección de la señal. Cuanto mayor sea la distancia entre la matriz de registro con respecto al electrodo de referencia, más grande será la amplitud de la señal detectada. Por ejemplo, en el caso del acero inoxidable, esa relación es casi lineal ($R^2 > 0,95$); es decir, la amplitud de la señal registrada aumenta 2 veces si el electrodo está a una distancia el doble de grande del electrodo de referencia.

◦ **Matriz de electrodos de registro**

Debido a la amplitud extremadamente baja de las señales bio-potenciales producidas por animales acuáticos, los registros originales deben ser de calidad superior para permitir una correcta interpretación de las señales. En la presente invención, se han desarrollado electrodos y configuraciones de electrodos específicos para alcanzar esto. Sus características se describen a continuación.

Material: El cobre, la plata y el aluminio han demostrado experimentalmente ser los materiales más adecuados para la construcción de los electrodos. En concreto, estos metales tienen una alta conductividad, una alta relación señal-ruido, no se oxidan, su rendimiento no se ve afectado por el ambiente ácido y su comportamiento eléctrico es independiente de la frecuencia de la señal. Todas estas características son esenciales para permitir que el electrodo detecte las señales muy bajas a partir de la actividad biológica de los animales acuáticos, y hacerlo de una manera fiable y resistente, a pesar de las duras condiciones ambientales.

Bajo un punto de vista biológico, los electrodos construidos con esos materiales y configuraciones de la forma en que lo están en el dispositivo presentado no son tóxicos para la vida animal, no liberan iones en los medios acuáticos, y son visualmente irrelevantes para los animales: no causan ningún estrés visual o restricción de movimientos de los animales. Estos metales pueden cortarse fácilmente en placas singulares que actúen como electrodos, o incrustarse en otros materiales de soporte como el plástico para crear hojas fácilmente portátiles, o incluso para incrustarse en las paredes de los acuarios. También se pueden obtener usando el proceso técnico habitual de placas de circuitos impresos, que permite el diseño de electrodos muy eficaces que pueden ser diseñados para cubrir toda la superficie de uno de los lados del depósito de agua, optimizando la adquisición de la señal y al mismo tiempo permitiendo un fácil transporte y sustitución. Una técnica similar (fabricación de película delgada) se puede utilizar para crear electrodos flexibles, imprimiéndolos directamente en una hoja delgada de plástico.

Los electrodos también se pueden fabricar con cables de alta calidad habiendo retirado su protección de plástico, de modo que los alambres finos internos estén expuestos al agua.

Los electrodos no necesariamente tienen que ser planos; pueden ser, por ejemplo, esféricos. En ese caso, en lugar de colocarlos incrustados en las paredes, varios de ellos podrían colocarse colgando de una estructura en forma de tela de araña para que puedan insertarse al mismo tiempo en el depósito, permaneciendo cerca de las paredes para evitar molestias a los animales en el depósito.

Disposiciones de electrodos: hay algunos parámetros a tener en cuenta en el diseño de los electrodos de registro:

- Área de los electrodos: el tamaño del electrodo influye en la calidad de la señal obtenida. Usando la relación señal-ruido como figura de mérito, la **figura 4** muestra cómo la calidad de la señal registrada (su relación señal-ruido) aumenta cuando aumenta el área de los electrodos. Y esto sucede para todas las frecuencias de la señal. Como cuestión de hecho, existe una relación casi lineal ($R^2 > 0,99$) entre el área del electrodo y la relación señal-ruido. Por lo tanto, cuanto mayor sea el área del electrodo, mayor será la calidad de la señal registrada. Como inconveniente, electrodos más grandes tienen menos resolución espacial, por lo que se reducirá la información acerca de en qué parte del depósito se está llevando a cabo la actividad de los animales.

- Distancia entre la fuente de señal y el electrodo: esta distancia también influye en la calidad de la señal obtenida como se muestra en la **figura 5**. La atenuación progresiva de la señal (como se ve por su ganancia negativa, medida en decibelios -dB) debido a la distancia entre la fuente de señal y el electrodo de registro es sin embargo menos importante que la sufrida por las frecuencias más altas. Numéricamente, para un electrodo de cobre, existe una diferencia media en la atenuación de menos de 0,5 dB para una diferencia de 30 cm de distancia. Por otra parte, hay una diferencia media en la atenuación de casi 8 dB para una diferencia de 3 órdenes de magnitud de la frecuencia de la señal de fuente. Esta diferencia en la atenuación es más importante en las frecuencias más bajas (hasta 10 Hz), donde la relación es logarítmica. Por lo tanto, dependiendo del tamaño del depósito, tienen que tenerse en cuenta estas características de la combinación de agua + electrodo.

◦ **Bio-amplificador**

5 El bio-amplificador es un instrumento muy sensible capaz de detectar y amplificar las pequeñas señales biológicas producidas por la actividad del (de los) animal(es) (EMG, ECG, etc.) de manera que puedan llegar a ser de amplitud apreciable. Dada la pequeña entidad de las bio-señales de los animales acuáticos, el uso de este instrumento es esencial.

◦ **Micro-procesador**

Una vez amplificadas, las señales se transmiten a un micro-procesador que está a cargo del filtrado y la interpretación de las mismas.

◦ **Filtrado de las señales**

10 Algunos de los problemas que no se han considerado en invenciones anteriores son el hecho de que la presencia de agua en el sistema puede afectar a la calidad de los registros y el hecho de que el nivel de ruido puede enmascarar las señales bio-potenciales completamente.

15 Nuestros resultados muestran que el agua dulce puesta en un depósito de agua actúa como un filtro de paso bajo. En otras palabras, actúa como un filtro que deja pasar las señales de baja frecuencia pero reduce considerablemente la amplitud de las señales con frecuencias superiores a la frecuencia de corte, que en este caso es de aproximadamente 2 Hz; es decir, las frecuencias superiores a 2 Hz se atenúan al menos - 3 dB (*es decir*, al menos 1.000 veces). Véase la figura 2 en la que se muestra un diagrama de Bode del agua. El agua atenúa completamente los componentes de alta frecuencia de las señales producidas por los animales acuáticos, pero el ruido electromagnético de alrededor puede llegar a los electrodos sin cruzar mucho volumen de agua, por lo que los componentes de alta frecuencia registrados por los electrodos son sin duda solo ruido, no señales procedentes de los animales. Esa es la razón por la cual el filtrado de paso bajo es tan crítico.

20 El ruido electromagnético encontrado en la medición de bio-potenciales de los animales acuáticos se identificó como ruido blanco; una señal aleatoria con una densidad espectral de potencia plana. En otras palabras, la señal contiene la misma potencia dentro de un ancho de banda fijo en cualquier frecuencia central, excepto alrededor de la frecuencia de la red eléctrica (50 Hz en Europa).

25 Se llevó a cabo un estudio para identificar la frecuencia de las bio-potenciales de los animales acuáticos. De hecho, con el fin de desarrollar un sistema capaz de detectar señales biológicas de animales de manera eficiente, es necesario identificar en qué ancho de banda de frecuencia necesitamos filtrar para poder eliminar el ruido y retener la señal procedente de la actividad de los animales. Con este fin, se obtuvieron registros con animales puestos en un depósito de agua y se filtraron usando diferentes filtros de paso de banda. Las señales registradas se filtraron con 11 filtros diferentes de paso banda y la relación señal-ruido se calculó para cada ancho de banda (de 10 a 1000 Hz). Los resultados indicaron que la relación señal-ruido más alta se encuentra en las frecuencias más bajas, lo cual indica que la señal producida por el animal (después de cruzar el agua en el depósito) estaba en las frecuencias bajas. Por esta razón, un filtro de paso bajo de 0 Hz a 20 Hz es esencial para la invención, ya que elimina tanto ruido como sea posible de los registros, pero al mismo tiempo conserva gran parte de la señal original.

30 Un filtro de paso bajo es un filtro electrónico o de software que permite el paso de señales de baja frecuencia, pero atenúa (reduce la amplitud de) señales con frecuencias superiores a la frecuencia de corte. Un filtro de paso bajo de software se puede implementar mediante, por ejemplo, una media móvil ponderada exponencialmente, que viene dada por la siguiente ecuación:

40
$$s_t = \sum_{n=1}^k w_n x_{t+1-n} = w_1 x_t + w_2 x_{t-1} + \dots + w_k x_{t-k+1}$$

donde $\{w_1, w_2, \dots, w_k\}$ es un conjunto de factores de ponderación de tal manera que $\sum_{n=1}^k w_n = 1$,

x es la señal original, y s la señal filtrada.

En nuestra solicitud, un filtro de este tipo nos permite definir un umbral, las amplitudes por debajo del cual se consideran como ruido (véase la **figura 3**), y por lo tanto separar la señal objetivo de la señal de fondo.

45 ◦ **Interpretación de la señal**

La señal detectada y procesada es entonces correlacionada con el nivel de movimiento y la actividad de los animales mediante una escala de actividad 0 a 100 % de la siguiente manera:

- Para el 0 %, se realiza un registro con el sistema con el depósito lleno de agua, pero sin ningún animal en el mismo. Por lo tanto, este nivel corresponde a la amplitud del ruido electromagnético presente en el ambiente.

- Para el 100 %, se realiza un registro de varios animales, uno por uno, muy cerca de los electrodos, en condiciones de estrés, por lo que el animal hace varios movimientos fuertes. La media de este tipo de registros nos da una estimación del nivel máximo de la señal que podemos esperar de un animal colocado lo más cerca posible del electrodo. A continuación, la escala se ajusta multiplicando esa media por la cantidad de animales presentes en el depósito en cada momento.

5 Además, se obtienen otros varios parámetros a partir de las señales proporcionadas por los electrodos, tales como: dónde pasan más tiempo los animales (por ejemplo, parte superior o inferior del depósito), si existe un grupo compacto de animales o varios subgrupos y si hay un nivel constante de actividad o si hay picos repentinos de actividad, etc.

- 10 Con estos parámetros, creamos un "vector de estado" a partir del cual se pueden realizar estudios de comportamiento (incluyendo la medición del nivel de estrés de los animales acuáticos) usando un clasificador automático entrenado con un amplio conjunto de señales por un experto humano en el comportamiento de los animales.

Experimentos y corroboraciones

- 15 Con el fin de verificar si la correspondencia entre las señales biológicas adquiridas y el movimiento de los animales era fiable, se llevaron a cabo registros con una cámara web al mismo tiempo que se registraron los bio-potenciales de los animales con el sistema.

20 La alta correlación numérica encontrada entre esas dos señales validó que el sistema efectivamente es capaz de detectar la actividad de los animales a través de la evaluación de las señales biológicas. Véase la **figura 6** como ejemplo de esa alta correlación, donde puede verse que la misma es, como de costumbre, significativa ($> 0,68$).

25 En resumen, la invención puede proporcionar una indicación precisa, cuantificable y específica del nivel de estrés / bienestar de los animales acuáticos en condiciones de vida normales así como en condiciones experimentales, sin interferir con la vida de los animales, ya que no se aplica corriente eléctrica a los animales, la señal detectada es directamente la señal producida por la actividad de los animales y la posición de los electrodos no interfiere con los movimientos de los animales.

30 Por lo tanto, las señales adquiridas con el sistema de la invención pueden utilizarse: i) para controlar el estado de bienestar de los animales en experimentos de laboratorio, en casas particulares (como hobby); en restaurantes que muestran animales acuáticos comestibles, como pescado y marisco en depósitos; en instalaciones de acuicultura, etc.; ii) como un enfoque alternativo / de apoyo a los sistemas basados en vídeo en las pruebas de comportamiento y neurológicas; y iii) para probar la calidad del agua (con el animal actuado como un sensor viviente). Por otra parte, las señales adquiridas se pueden correlacionar con una escala específica que indica cuantitativamente el nivel de estrés / bienestar de los animales.

35 Ha de apreciarse que en este texto, el término "comprende" y sus derivaciones (tales como "que comprende", etc.) no han de entenderse en un sentido excluyente, es decir, estos términos no deben interpretarse como excluyentes de la posibilidad de que lo que se describe y se define pueda incluir más elementos, etapas, etc.

40 Por otra parte, la invención, obviamente, no se limita al (a los) modo(s) de realización específico(s) descritos en el presente documento, sino que también abarca cualquier variación que pueda ser considerada por cualquier persona experta en la técnica (por ejemplo, en cuanto a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.), dentro del alcance general de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Sistema para detectar el nivel de incomodidad de los animales acuáticos durante los estudios experimentales, comprendiendo el sistema:
- un depósito de agua (1)
- 5
- un electrodo de referencia (2) colocado en uno de los lados del depósito,
 - electrodos de registro (3, 3a, 3b),
 - un bio-amplificador (4) para amplificar una bio-síñal recibida en el electrodo de registro,
 - un micro-procesador para el tratamiento de las señaes
- 10
- un filtro de paso bajo para el filtrado de las señaes recibidas, **caracterizado porque** dichos electrodos de registro (3, 3a, 3b) están en la forma de placas de circuitos impresos (PCB) diseñadas para cubrir toda la superficie de otro lado del depósito de agua, y dicho filtro de paso bajo tiene una frecuencia de corte de 20 Hz.
2. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los electrodos de referencia y de señaal (2, 3, 3a, 3b) están fabricados del mismo material.
- 15
3. Sistema de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los electrodos (2, 3, 3a, 3b) están fabricados de aluminio, cobre o plata.

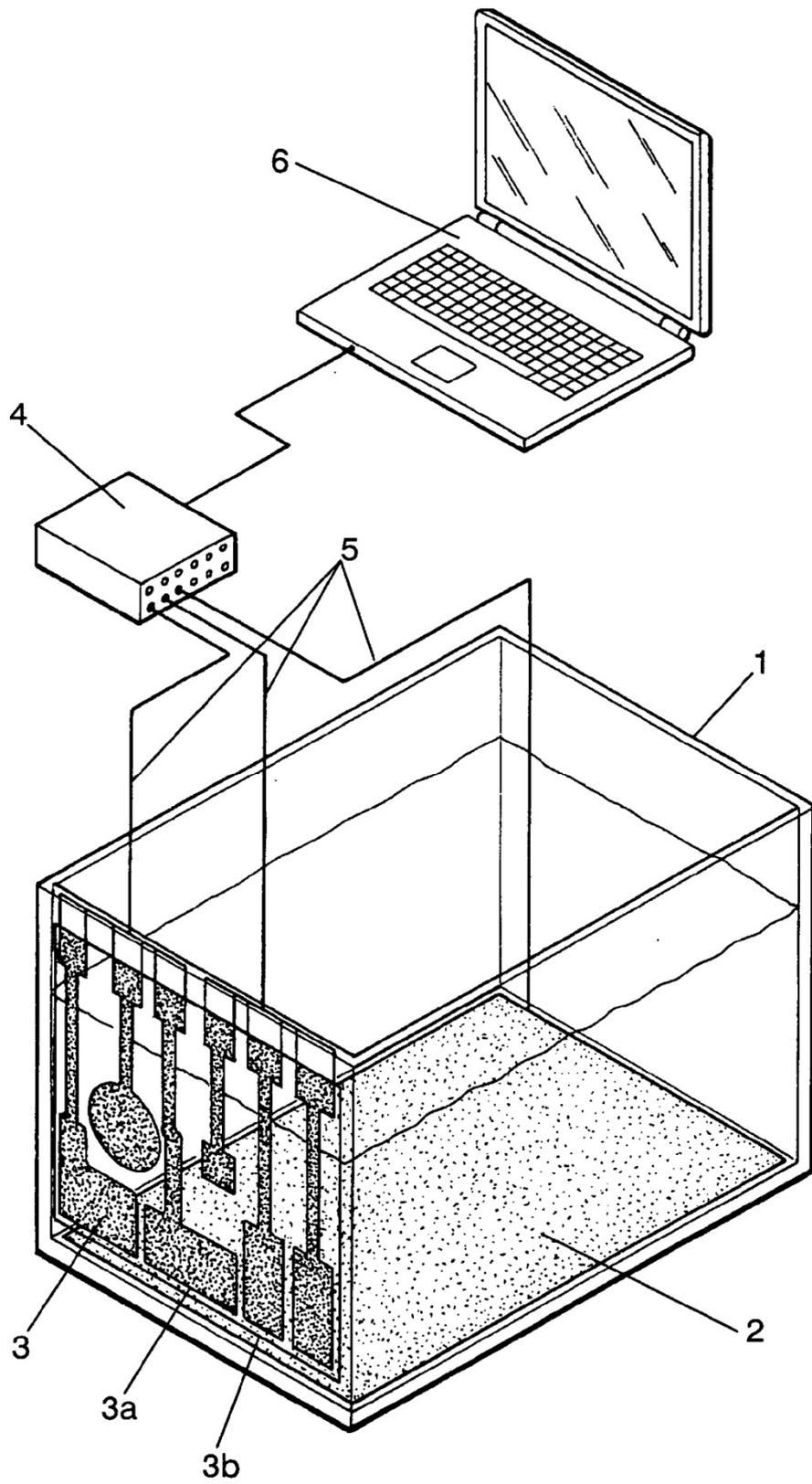


FIG. 1

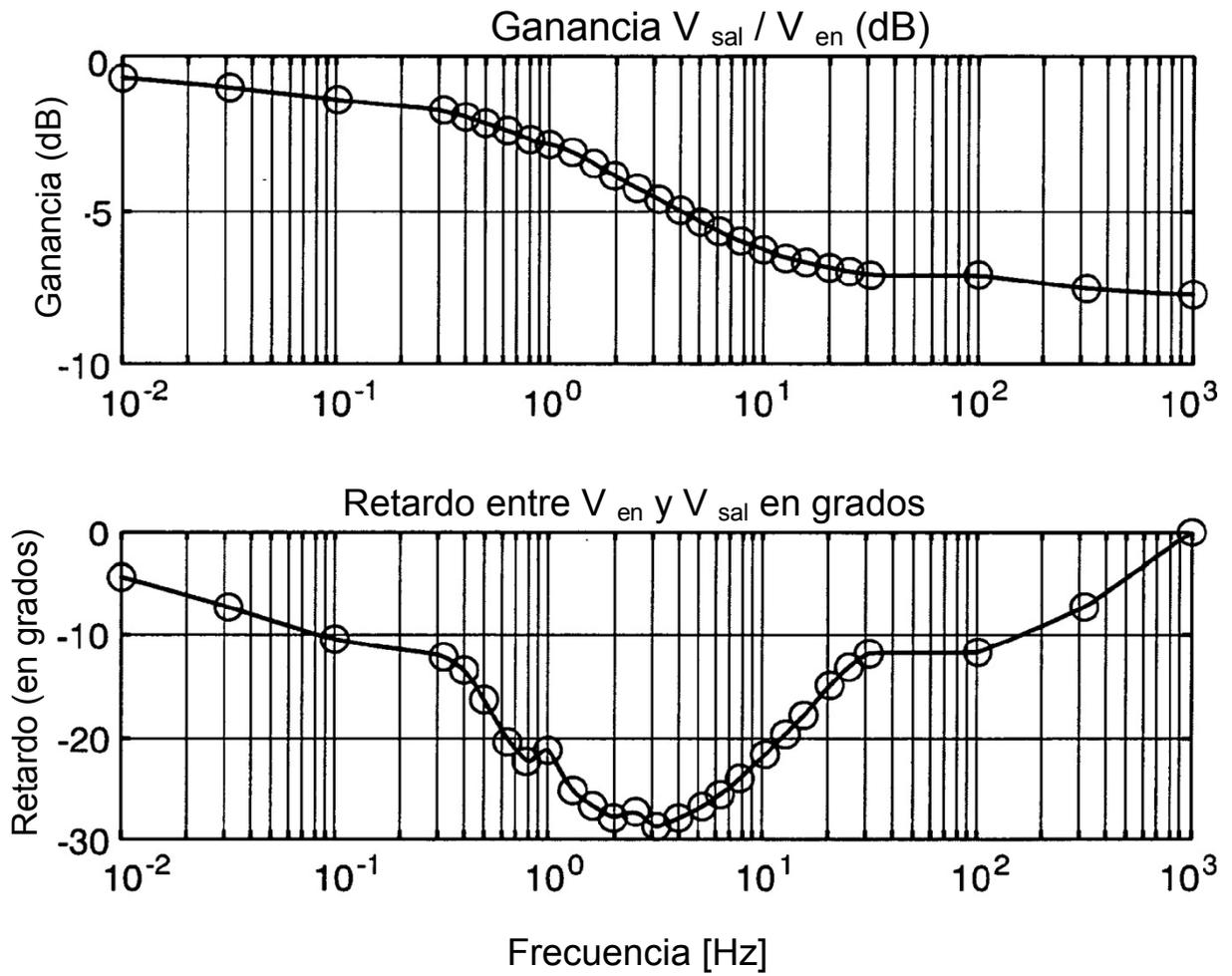


FIG. 2

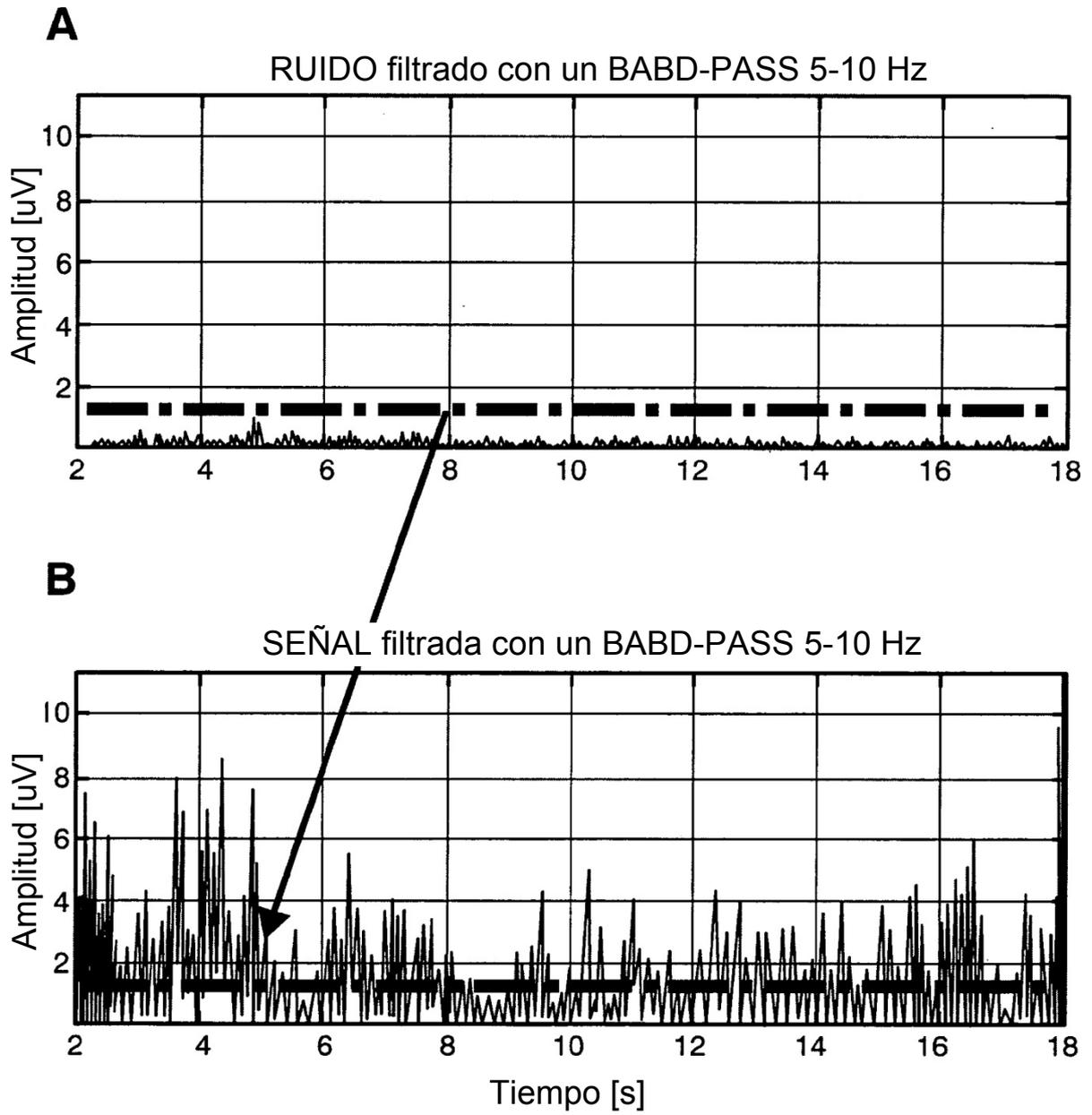


FIG. 3

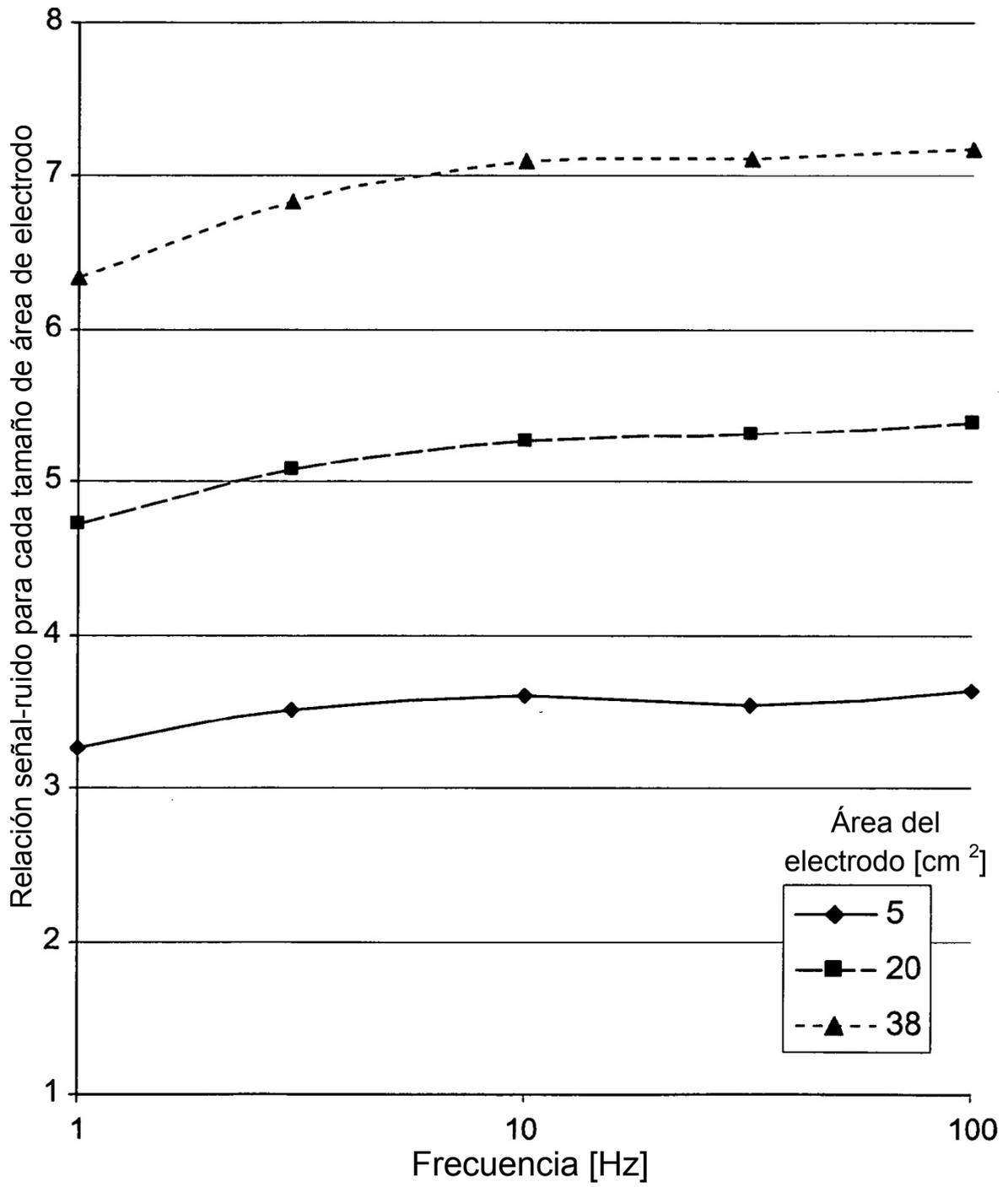


FIG. 4

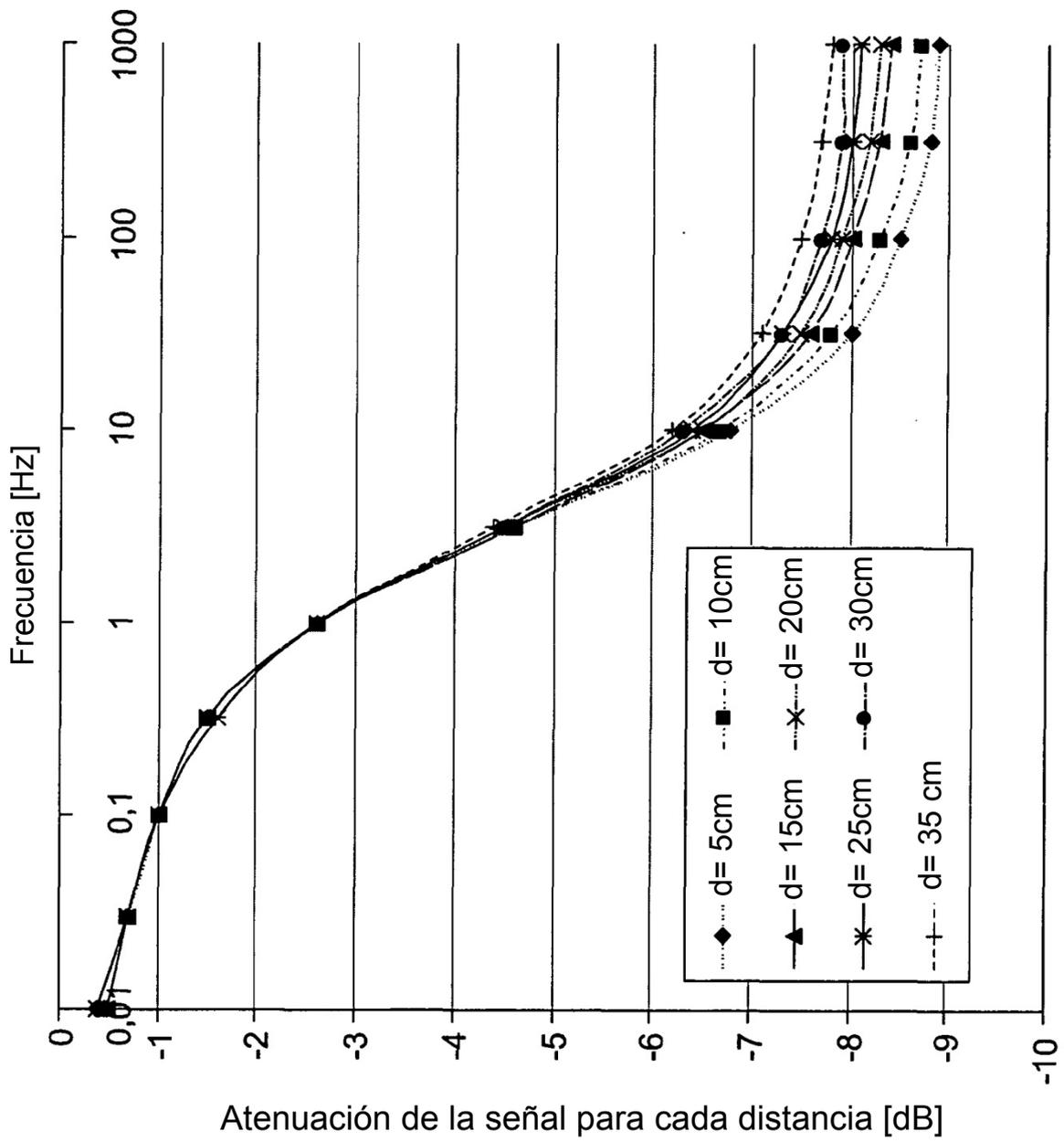


FIG. 5

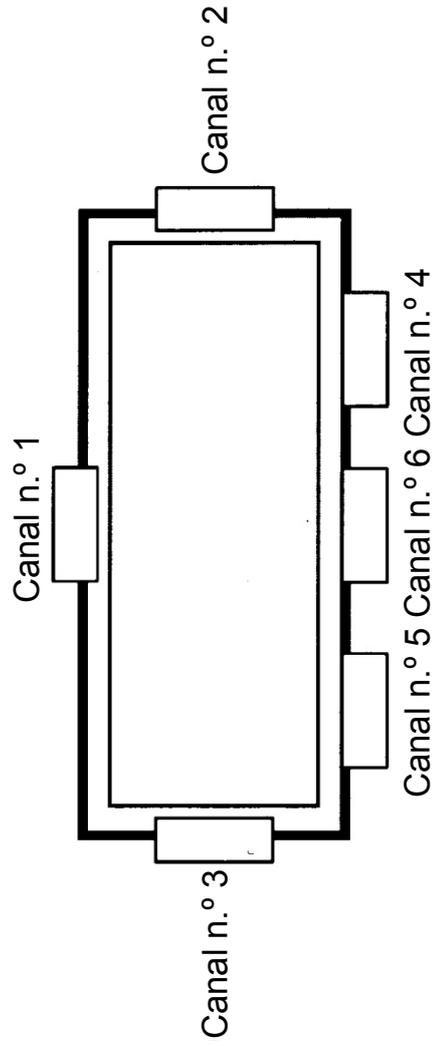
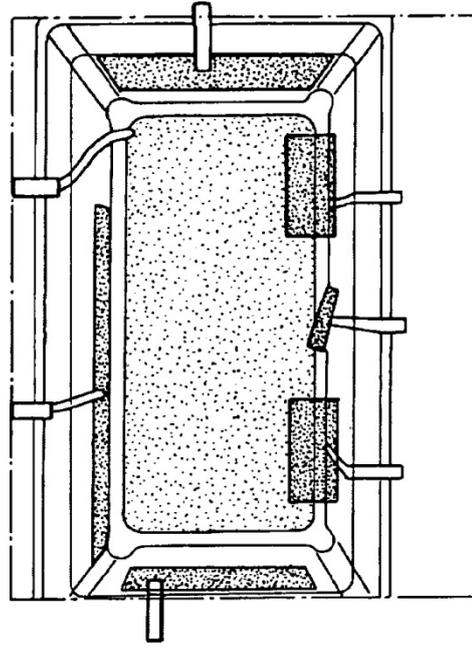


FIG. 6A

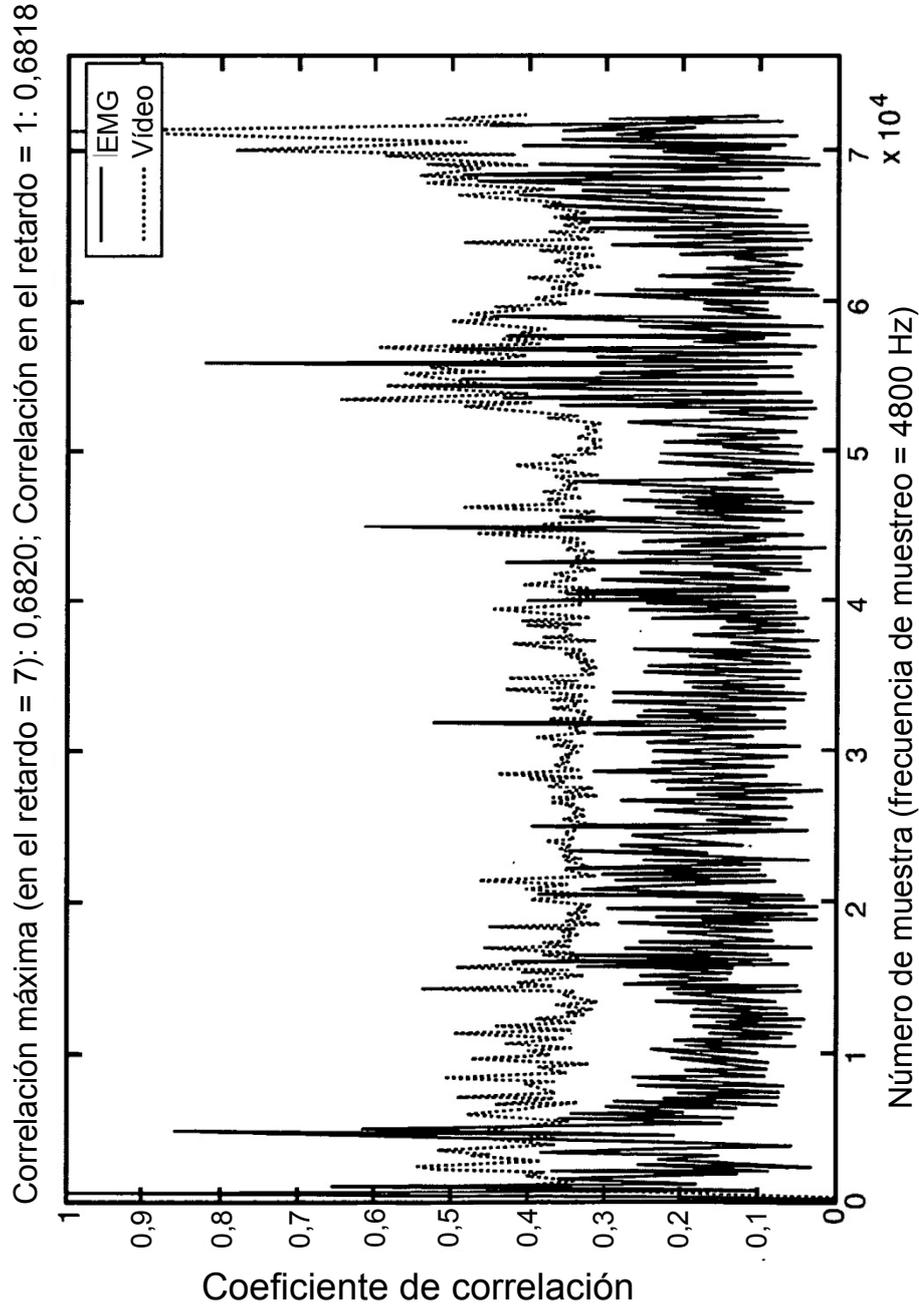


FIG. 6B