

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 435**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/48** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/EP2014/056138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14718010 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2978436**

54 Título: **Composiciones que comprenden complejos de proantocianidinas con proteínas de guisantes**

30 Prioridad:

**28.03.2013 IT MI20130476**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**NOVINTETHICAL PHARMA SA (100.0%)  
Via Pian Scairolo 11  
6915 Pambio-Noranco, Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**ALONSO, MIGUEL ANGEL;  
DI FULVIO, MARCO y  
DI SCHIENA, MICHELE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 622 435 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

Composiciones que comprenden complejos de proantocianidinas con proteínas de guisantes

5 La invención se refiere a complejos de proantocianidinas con una proteína de guisante como ingredientes activos en composiciones para uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, en particular trastornos causados por alteraciones del tejido epitelial intestinal (epitelio cilíndrico simple no ciliado).

Arte previo

10 La diarrea es un síntoma de muchos trastornos gastrointestinales y es a menudo incapacitante y peligrosa, especialmente en niños y ancianos. La diarrea aguda es causada principalmente por infecciones intestinales, pero también puede ser debido al uso de medicamentos o a la radioterapia y a otras condiciones patológicas (diverticulitis, intoxicación por metales pesados, isquemia intestinal, alergias e intolerancias).

La diarrea aguda con una causa infecciosa es un problema serio en los países en desarrollo; se cree que causa la muerte de al menos 4 millones de niños menores de 5 años cada año.

La diarrea crónica se debe generalmente al síndrome del intestino irritable, enfermedad celíaca o enfermedades inflamatorias intestinales (enfermedad de Crohn, rectocolitis ulcerativa).

15 En vista de sus diferentes etiologías, existen diversas opciones de tratamiento basadas en la administración de antibióticos/antibacterianos, espasmolíticos/anticolinérgicos, probióticos u agonistas de los receptores opioides. Sin embargo, algunos de dichos tratamientos se deben administrar con gran precaución, ya que no actúan sobre el proceso patológico causal.

20 Los complejos de taninos complejados con proteínas animales y gelatinas, en particular con gelatina de origen bovino, albúmina, caseína u ovoalbúmina, se han propuesto desde hace algún tiempo como remedios eficaces para trastornos gastrointestinales.

Por ejemplo, el uso de dichos complejos en el tratamiento de las diversas formas de diarrea se describe en EP 1764105, EP 2526939, EP 2361623 y US 20090062191. El tanato de gelatina ha estado disponible en el mercado desde hace algún tiempo como un dispositivo médico para el tratamiento de la diarrea aguda.

25 Aunque los complejos conocidos hasta ahora son eficaces y bien tolerados, todavía hay necesidad de nuevos complejos con características mejoradas en términos de eficacia, seguridad, características organolépticas, estabilidad y compatibilidad con otros ingredientes de formulaciones orales. Además, los complejos conocidos y disponibles hasta la fecha se obtienen a partir de materiales proteínicos de origen animal, con los consiguientes problemas de seguridad asociados con la posible transmisión de enfermedades tales como BSE o alergias, que son particularmente frecuentes en el caso de las proteínas derivadas de la leche y huevos. Los complejos con proteínas animales también pueden dar lugar a problemas éticos o religiosos en algunas poblaciones de pacientes.

30 Por lo tanto, existe todavía la necesidad de nuevos tratamientos para reemplazar o acompañar a los disponibles en la actualidad.

Descripción de la invención

35 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que el complejo de proantocianidinas con proteína de guisante es particularmente eficaz en el tratamiento de trastornos causados por alteraciones del tejido epitelial intestinal (epitelio cilíndrico simple no ciliado). El complejo de la invención es ventajoso en términos de seguridad, porque está prácticamente desprovisto de toxicidad hepática, a diferencia de los taninos ya utilizados para tratar la diarrea y otros trastornos gastrointestinales.

40 "Trastornos causados por alteraciones del tejido epitelial intestinal" significa enfermedades intestinales inflamatorias (Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad celíaca, infecciones entéricas bacterianas y parasitarias (esto es, *Escherichia coli* enteropatógena, infección por *Giardia lamblia*, infección por *C. difficile*, etc.), y síndrome del intestino irritable.

45 "Complejo" significa una entidad química derivada de la interacción entre los grupos funcionales presentes en la proteína y en la estructura del polifenol. Dichas interacciones, principalmente de naturaleza iónica (tales como enlaces de hidrógeno), dan al complejo o aducto diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas de las de los componentes del complejo o su mezcla física.

"Proteína de guisante" significa una proteína en polvo obtenida por extracción de semillas de *Pisum sativum* disponibles en el mercado ([http://en.wikipedia.org/wiki/Pea\\_protein](http://en.wikipedia.org/wiki/Pea_protein)).

50 Un producto comercialmente disponible, por ejemplo, es suministrado por Dal Cin Gildo S.p.A. El producto está en forma de un polvo amarillento con un olor característico, que es poco soluble en agua.

- El término "proantocianidinas" se refiere a compuestos de polifenoles formados por la unión de 2 a 8 unidades de catequina. Las proantocianidinas son abundantes en diversas plantas, especialmente en pieles y pepitas de uva, arándanos rojos y arándanos, y algunos tipos de madera, como madera de quebracho. Las proantocianidinas, que pertenecen a la familia de los taninos condensados, tienen un alto nivel de actividad antioxidante, y diversos estudios han demostrado su eficacia en la reducción de la presión sanguínea, reduciendo la agregación plaquetaria y contrarrestando el progreso o aparición de trastornos del sistema cardiovascular. Las proantocianidinas también poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antiangiogénicas, antitumorales y quimiopreventivas. Existen en el mercado diversas preparaciones de proantocianidinas, especialmente preparaciones de proantocianidinas extraídas de *Vitis vinifera*.
- La proteína de guisante y el complejo de proantocianidina se pueden preparar mezclando una suspensión acuosa de la proteína con una solución de proantocianidinas. En particular, la proteína de guisante se suspende en agua, preferiblemente en la proporción de 1:20 p/v. A esta suspensión se adiciona una solución de proantocianidinas obtenida a partir de pepitas de uva en la proporción de 1:10 p/v en agua.
- La proporción de proteína de guisante con proantocianidinas oscila entre 1:0.1 y 1:2.5; está preferiblemente entre 1:0.5 y 1:2; y más preferiblemente de 1:1.5.
- Puede ser útil acidificar la suspensión de proteína de guisante en agua, por ejemplo, con ácido cítrico, ácido ascórbico u otros ácidos, para mejorar la solubilidad de la proteína; el pH está entre 3 y 5, preferiblemente entre 3.5 y 4.5.
- La temperatura puede variar dentro de un amplio intervalo durante la preparación del complejo: preferiblemente entre 10°C y 50°C, y más preferiblemente entre 20°C y 40°C.
- El complejo se aísla por métodos conocidos, tales como filtración, centrifugación, secado por pulverización, liofilización, etc.
- El complejo se puede secar bajo vacío, en una corriente de aire, en secadores de lecho fluido, etc., a una temperatura preferiblemente comprendida entre 20°C y 40°C.
- El complejo obtenido de este modo es muy estable a la humedad ambiental, incluso a temperaturas que exceden la temperatura ambiente. El complejo de la invención, ya sea solo o combinado con otros ingredientes activos y/o excipientes, se puede formular en formas de administración apropiadas para los usos recomendados.
- Otros ingredientes activos que se pueden combinar ventajosamente con los complejos de la invención incluyen antibióticos, agentes antimotilidad, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, compuestos para el tratamiento de la hinchazón gastrointestinal (simeticona y similares), mesalazina, sucralfato, polisacáridos naturales y sintéticos tales como pectinas, quitosano (animal o vegetal), ácido hialurónico, goma guar, goma de xantano, gelatina animal, celulosa y hemicelulosa y derivados tales como hidroxipropilcelulosa, carragenanos, carbómeros y compuestos de reticulación/polimerización tales como ácido ferúlico; y probióticos, tales como Lactobacilli, Bifidobacteria, levaduras y similares.
- El complejo de la invención es útil para el tratamiento y prevención de trastornos gastrointestinales y otros trastornos originados en el sistema gastrointestinal y transferidos a otros sistemas, tales como el sistema urogenital. El complejo de la invención también es útil para prevenir la proliferación de patógenos en el sistema gastrointestinal y su transferencia a otros sistemas del cuerpo humano a través de las uniones intestinales estrechas. El complejo de la invención es también útil para proteger la mucosa intestinal contra agentes químicos o físicos que pueden reducir la funcionalidad y la regeneración natural del epitelio intestinal y para reducir el flujo paracelular de patógenos a través de las paredes intestinales.
- Ejemplos de formas de administración apropiadas incluyen cápsulas, comprimidos, soluciones, suspensiones, gránulos, geles, etc. Ejemplos de otros ingredientes activos con los que la proteína de guisante y el complejo de proantocianidina se pueden combinar incluyen antibióticos, agentes antimotilidad, antiinflamatorios, compuestos para el tratamiento de flatulencias gastrointestinales, prebióticos, probióticos, etc.
- En vista de su ausencia sustancial de toxicidad, la proteína de guisante y el complejo de proantocianidina se pueden administrar varias veces al día a dosis que oscilan entre 50 mg y 6000 mg/día.
- En particular, el complejo de proantocianidina y proteína de guisante, además de ser muy eficaz y seguro, es estable a la hidrólisis y oxidación del componente proantocianidina.
- Los siguientes ejemplos ilustran la invención con mayor detalle.
- Ejemplo 1
- Preparación de complejo

- A) Se suspenden 10 g de proteína de guisante (Dal Cin Gildo S.p.A.) en 200 g de agua purificada. El pH de la suspensión se ajusta desde pH 6.3 a pH 4 con ácido cítrico anhidro, 20% de sol. p/v en agua. La suspensión se deja bajo agitación durante 3 horas, y la temperatura se incrementa a 30°C.
- 5 B) Se disuelven 10 g de proantocianidinas (extracto seco de semilla de uva (r), Indena Spa) en 100 mL de agua purificada; la solución se prepara poco antes del uso, ajustando el pH desde 6.7 a 4 con ácido cítrico anhidro, 20% de sol. p/v en agua y se calentó a 30°C; la solución de color rojo oscuro se adiciona en porciones a la suspensión A), todavía bajo agitación.
- El complejo en suspensión homogénea que se forma inmediatamente es rojo oscuro, mientras que la solución acuosa es rojiza.
- 10 La suspensión se mantiene bajo agitación durante 3 horas, dejando caer la temperatura a 20 °C.
- Se detiene la agitación y se deja reposar la suspensión durante otras 8 horas, tiempo durante el cual se decanta rápidamente. La suspensión se filtra a través de papel a baja presión.
- El sólido se lava con 100 mL de agua purificada acidificada a pH 4 con una solución de ácido cítrico en porciones de 20 mL, aspirando cuidadosamente cada vez; el último lavado es prácticamente incoloro. El sólido se seca en estufa a 35-40°C hasta que alcanza un peso constante.
- 15 Rendimiento: 14.5 g; un sólido de color rojo ladrillo, inodoro, prácticamente insípido.
- Datos de análisis
- La figura 1 muestra el espectro de <sup>1</sup>H RMN del complejo caracterizado por señales ampliadas en la región a δ 7.0, atribuible a los protones aromáticos de las proantocianidinas.
- 20 La formación de un complejo que se deriva de la interacción química entre el componente proteico y el componente polifenólico se demuestra por la técnica RMN 2D DOSY (espectroscopía de difusión ordenada).
- El espectro tiene un eje horizontal (T2) que se refiere a las frecuencias de resonancia del protón (δ o ppm), y un eje vertical (T1) que presenta el parámetro de difusión.
- 25 Las figuras 2, 3 y 4 muestran los espectros registrados para proantocianidina obtenida de *Vitis vinifera*, proteína de guisante, y el complejo de la invención, respectivamente.
- Se pueden observar señales distribuidas entre los valores en log (m<sup>2</sup>/s) (T1) de -9.2 y -10.5 en el espectro de proantocianidina obtenido de *Vitis vinifera*.
- Por el contrario, el espectro 2D DOSY de proteína de guisante presenta señales con valores de T1 entre -8.7 y -10.1. El complejo tiene un comportamiento diferente del anterior, con señales que oscilan entre -9.1 y 10.0.
- 30 Esto indica que existe una interacción entre la especie para formar una situación diferente de los componentes. Se sugiere que la interacción entre proteína y proantocianidina provoca modificaciones en la estructura de la proteína, haciéndola más compacta y consecuentemente obteniendo un coeficiente de difusión diferente.
- También se realizaron ensayos de permeación de gel por HPLC. La elución isocrática se llevó a cabo con un sistema móvil formado por agua, ácido fórmico al 0.1% y metanol al 3% (velocidad de flujo de 1 mL/min, ELSD 60°C, 1.2 bar de N<sub>2</sub>), fase estacionaria Tosohaas TSK G5000 PWXL 7.8 x 300 mm.
- 35 Los cromatogramas muestran la interacción entre proteína y proantocianidina. En particular, el cromatograma de la mezcla de proteínas de guisantes (Figura 5) muestra claramente un pico predominante en aproximadamente 10 minutos, mientras que el 95% de extracto de uva negra muestra un pico predominante a casi 11 minutos y un pico más pequeño a aproximadamente 10 minutos. (Figura 6).
- 40 El complejo 50:50 muestra un cromatograma diferente (Figura 7), caracterizado por un pico a tiempos de retención que exceden aproximadamente 13 minutos, confirmando las observaciones de RMN.
- Ejemplo 2 - Ensayos biológicos in vitro
- La eficacia de la barrera y la estabilidad química del complejo de la invención se evaluaron por comparación con la tanato de gelatina comercial (Tasectan®) en el epitelio intestinal utilizando el modelo predictivo bien establecido de células Caco-2, una línea celular del epitelio intestinal derivado de un adenocarcinoma colorrectal (ATCC HTB 37) (Cell. Biol. Toxicol., 2005, 21 (1) 1-26).
- 45 Se determinaron el flujo paracelular y la permeabilidad de la barrera de los compuestos ensayados.

El flujo paracelular se determinó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), que proporciona una medición directa de la función de barrera y es otro parámetro de la integridad de la barrera en las uniones estrechas.

La permeabilidad de la barrera se midió determinando el paso del colorante Lucifer Yellow (Le Ferrec et al., *Altern Lab Anim.* 2001 Nov-Dec; 29(6):649-68; Hidalgo et al., *Gastroenterology.* 1989 Mar; 96(3):736-49) después de la exposición al tratamiento con los compuestos ensayados. Este ensayo se utilizó para evaluar la integridad de las uniones celulares en presencia de la sustancia ensayada. De acuerdo con la técnica descrita por Zucco et al., *Altern. Lab Anim.* 2005 Dec;33(6):603-18, la monocapa celular se incubó con los compuestos ensayados a la concentración de 5 mg/mL a dos valores de pH diferentes, 7.4 y 8.3. La TEER se evaluó a tiempo 0 y después de 4 horas, y el flujo del colorante Lucifer Yellow se monitorizó durante dos horas después del tratamiento con los productos ensayados.

- 5
- 10 Los resultados demostraron la capacidad de los productos ensayados para actuar como agentes formadores de película capaces de restaurar la función de barrera y reducir su permeabilidad con el fin de proteger la mucosa intestinal y la estructura de las uniones celulares estrechas. El complejo de la invención resultó estable y activo hasta pH 8.3, a diferencia del tanato de gelatina, que es activo a pH 7.4 pero menos activo a pH 8.3, muy probablemente debido a la hidrólisis de los taninos.
- 15 Por lo tanto, el complejo de proantocianidina es más estable que el tanato de gelatina conocido en el medio alcalino típico del medio intestinal.

#### Ejemplo 3 - Ensayos biológicos in vivo

Se evaluó la actividad del complejo de proantocianidina obtenido a partir de *Vitis vinifera* y proteína de guisante sobre la permeabilidad intestinal alterada e inflamación intestinal inducida por lipopolisacárido (LPS).

- 20 Se han utilizado grupos de 8 ratas Wistar macho (200-225 g). Después de una noche de ayuno, los animales se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con 250  $\mu$ L de solución salina estéril (NaCl al 0.9%) que contenía o no (control) 1 mg/kg de lipopolisacárido (LPS) de *E. Coli*. Se ha demostrado previamente que esta dosis altera la permeabilidad intestinal y libera citocinas proinflamatorias en la mucosa (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  (Moriez R., *Am J Pathol.* 2005;167(4):1071-9). Seis horas después se sacrificaron los animales y se utilizaron tiras de yeyuno para la evaluación de TEER y la permeabilidad paracelular FITC-dextrano. Otros segmentos también se recogieron para otros parámetros de la inflamación de la mucosa (mieloperoxidasa-MPO).
- 25

Seis horas después de la administración de LPS, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se retiró la parte proximal del yeyuno. Se montaron tiras de yeyuno en cámaras de tipo Ussing (Physiologic Instruments, San Diego, CA). Ambos lados de cada capa de colon se bañarán en solución reguladora Krebs-Henseleit (Sigma) y se oxigenarán a una temperatura mantenida de 37°C. Después de 15 minutos para el equilibrio, se midió TEER y se reemplazó 1 mL de solución reguladora con solución salina fisiológica y 500  $\mu$ L de FITC-dextrano (4000 MW, 0.022 g/mL, Sigma) en el lado mucosal de cada cámara. La intensidad de fluorescencia generada se midió entonces 1 hora más tarde.

30

#### Actividad de mieloperoxidasa (MPO)

- 35 La actividad de MPO, un marcador de gránulos primarios de neutrófilos polimorfonucleares, se determinó en tejidos proximales de yeyuno, de acuerdo con un método modificado de Bradley et al., (1982). Después del sacrificio, se retiraron las muestras de colon y se congelaron hasta la determinación de la actividad de MPO. En resumen, los segmentos de colon se trituraron utilizando un Polytron, antes de ser sometidos a 3 ciclos de congelación-descongelación y centrifugación. Los sobrenadantes se desecharon y las pellas se resuspendieron en un detergente que libera MPO. Estas suspensiones se sonicaron sobre hielo, y luego se centrifugaron otra vez. Las pellas se desecharon y los sobrenadantes se ensayaron espectrofotométricamente para medir la actividad de MPO y las mediciones de proteínas. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Bio Rad Detergent Compatible Protein Assay, BIO Rad, Ivry-France), y la actividad de MPO se expresará como U MPO/g de proteína.
- 40

El protocolo experimental se realizó en grupos de 8 ratas Wistar machos (Janvier S.A., Le Genest St. Isle, Francia) que pesaban 200-225 g en el momento de los experimentos. El protocolo consistió en una administración oral preventiva del complejo de la invención a una dosis de 500 mg/kg o su vehículo (agua) 2 horas antes de la inyección ip de LPS de *E. coli* (1 mg/kg). Estos experimentos se llevaron a cabo finalmente en 3 grupos separados de animales:

45

- 1 grupo como grupo de control (vehículo) - sin LPS
- 1 grupo como el grupo positivo (vehículo + LPS)
- 1 grupo compuesto CL-8 (500 mg/kg + LPS)

- 50 Permeabilidad intestinal:

Seis horas después del tratamiento IP con LPS, utilizando las mediciones de cámara la permeabilidad yeyunal al FITC-dextrano indicó que había un enorme aumento en la permeabilidad a las macromoléculas, este aumento también fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) reducido por el compuesto de la invención (500 mg/kg de PO) en un 64.6%.

Los resultados se describen en la figura 8 que muestra la influencia de un solo tratamiento oral sobre la permeabilidad yeyunal incrementada inducida por LPS en ratas (permeabilidad media  $\pm$  SEM n = 2x8).

Actividad de mieloperoxidasa mucosa (MPO):

- 5 En condiciones basales, la actividad de MPO de la mucosa yeyunal es muy baja ( $52 \pm 31$  miliunidades/g de proteína) y esta actividad tisular aumentó a  $389 \pm 192$  miliunidades/g. de proteína cuando se mide 6h. Después de la administración de LPS. El complejo de la invención afectó significativamente ( $P \leq 0.05$ ) este aumento inducido por LPS en la MPO yeyunal.

Los resultados se describen en la figura 9 que muestra la influencia de un solo tratamiento oral sobre la actividad de MPO en la mucosa en ratas (MPO media  $\pm$  SEM n = 8)).

10 Ejemplo 4 - Formulación farmacéutica

Composición para el tratamiento de diarrea, 4 g de una dosis única de bolsita

Complejo de proteína de guisante con proantocianidinas (ejemplo 1)	0.500 g
Inulina	1.500 g
Maltodextrina	1.675 g
Ácido ascórbico	0.100 g
Monoglicérido (Rimulsoft super (V))	0.150 g
Dióxido de silicio (Aerosil 200)	0.020 g
Esteviosido (Stevia)	0.015 g
Coloración E160a (betacaroteno)	0.025 g

Reivindicaciones

1. Complejo de proteína de guisante y proantocianidinas para uso en el tratamiento de trastornos causados por alteraciones del tejido epitelial intestinal seleccionado del grupo de enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad celíaca, infecciones entéricas bacterianas y parasitarias y síndrome de intestino irritable.
- 5 2. Complejo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las proantocianidinas se extraen de *Vitis vinifera*, arándanos o arándanos o madera de *quebracho*.
3. Complejo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las proantocianidinas se extraen de *Vitis vinifera*.
4. Complejo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proporción entre la proteína de guisante y las proantocianidinas está entre 1:0.1 y 1:2.5.
- 10 5. Complejo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde el trastorno es diarrea.
6. Composiciones orales que comprenden el complejo como se reivindica en las reivindicaciones 1-5, en mezcla con portadores apropiados y opcionalmente con otros ingredientes activos para uso en el tratamiento de trastornos causados por alteraciones del tejido epitelial intestinal seleccionado del grupo de enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad celíaca, infecciones entéricas bacterianas y parasitarias y síndrome del intestino irritable.
- 15 7. Composiciones orales para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en combinación con otros ingredientes activos seleccionados entre antibióticos, agentes antimotilidad, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, compuestos para el tratamiento de la hinchazón gastrointestinal, mesalazina, sucralfato, pectinas, quitosano, ácido hialurónico, goma de guar, goma de xantano, gelatinas de animal, proteínas vegetales, celulosa y hemicelulosa, hidroxipropilcelulosa, carragenanos, carbómeros, ácido ferúlico, probióticos, tanato de gelatina y electrolitos.

20

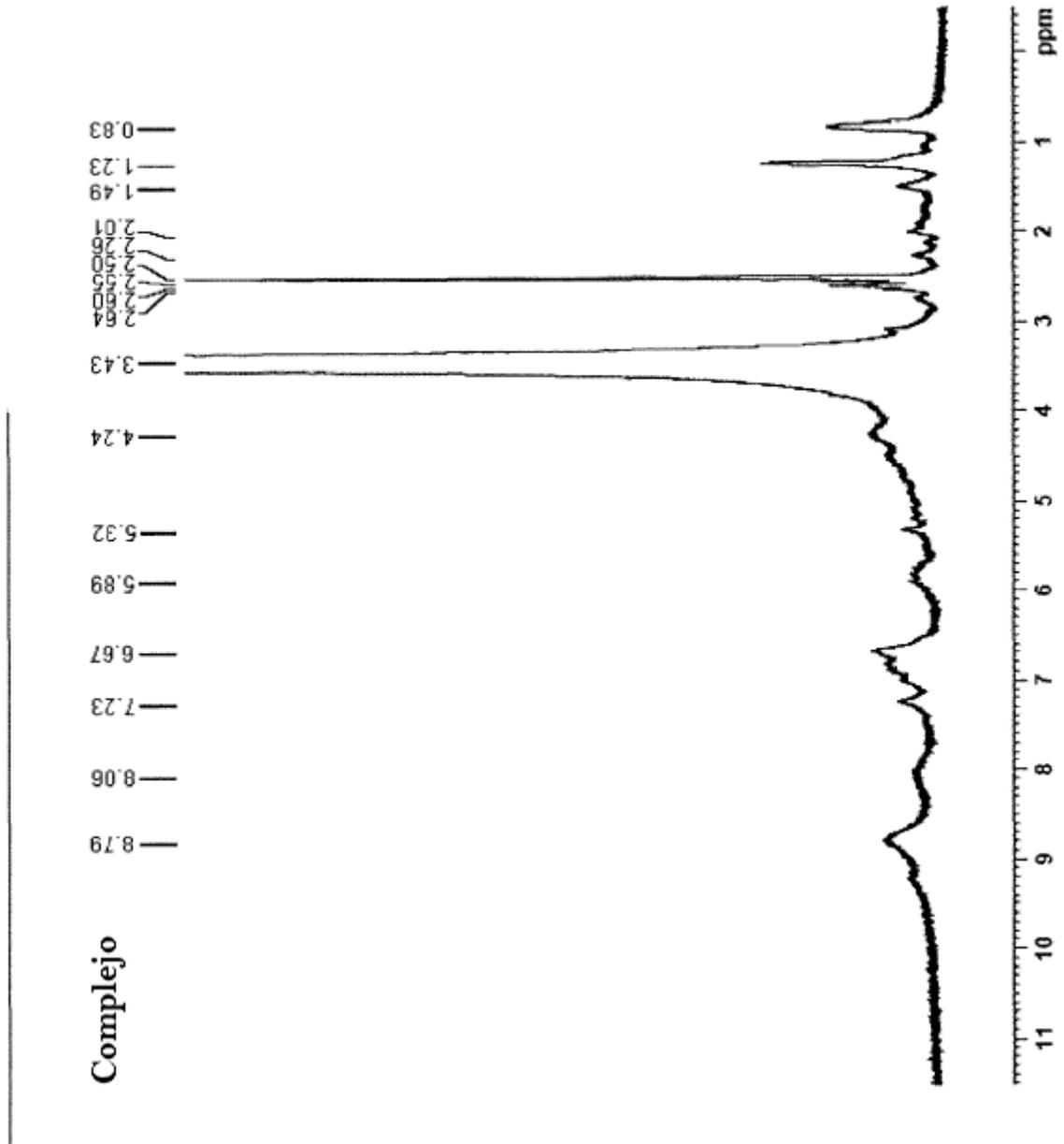


Figura 1

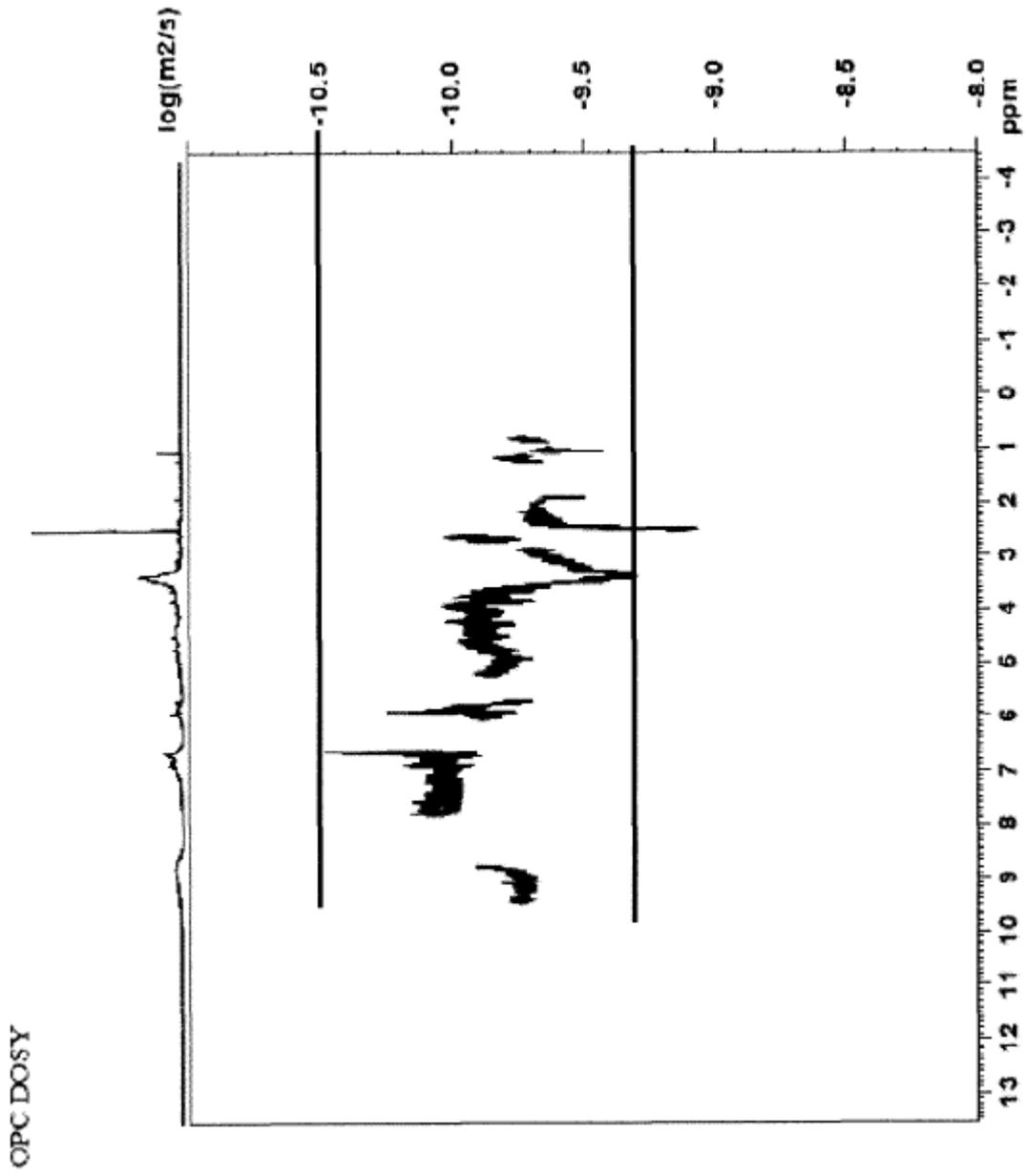


Figura 2

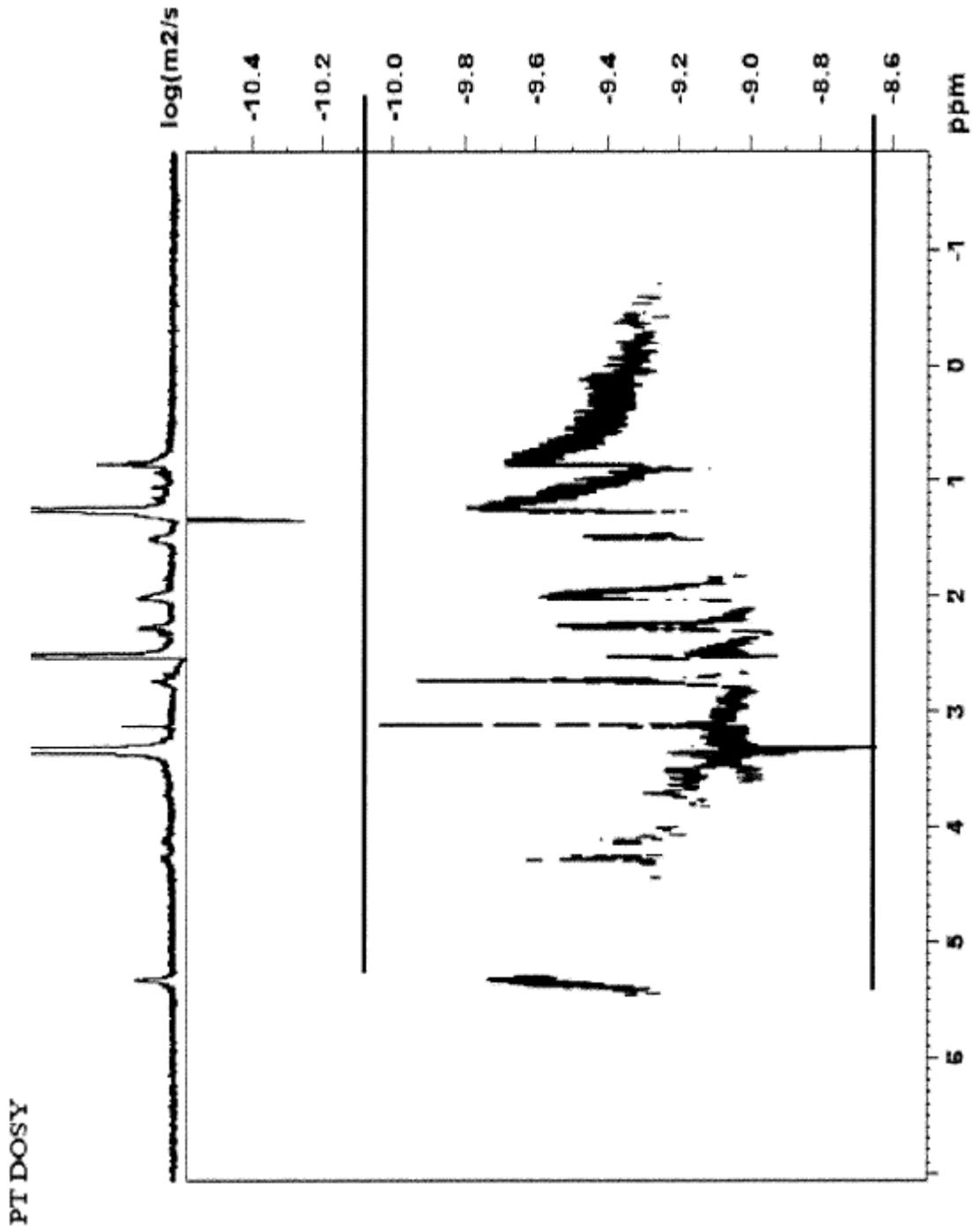


Figura 3

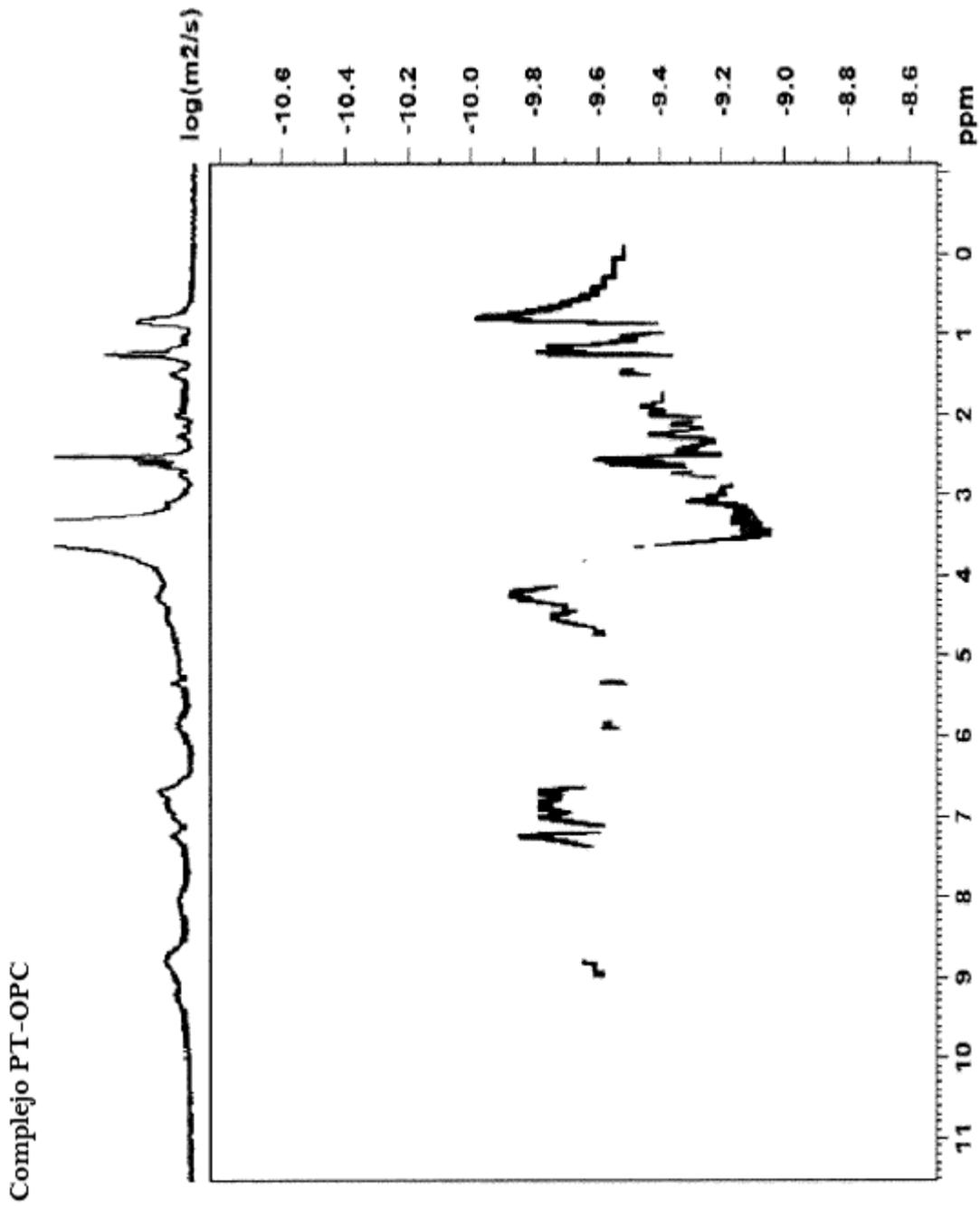


Figura 4

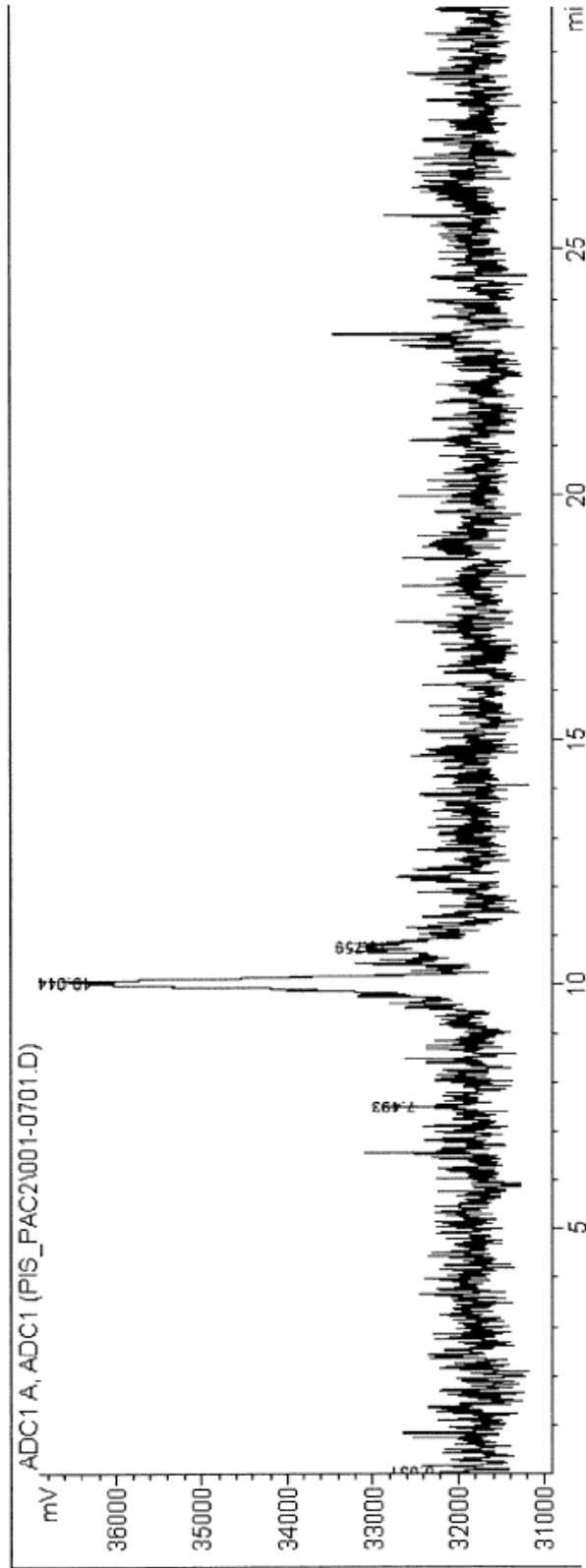


Figure 5

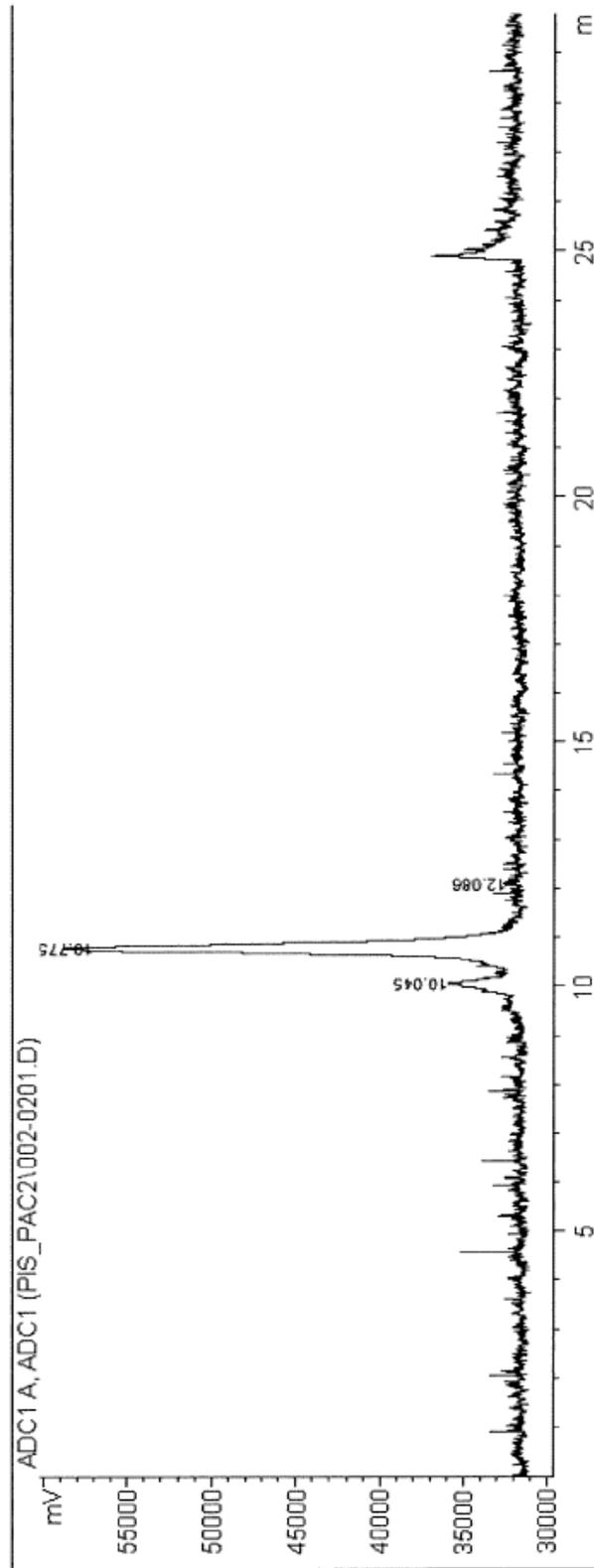


Figura 6

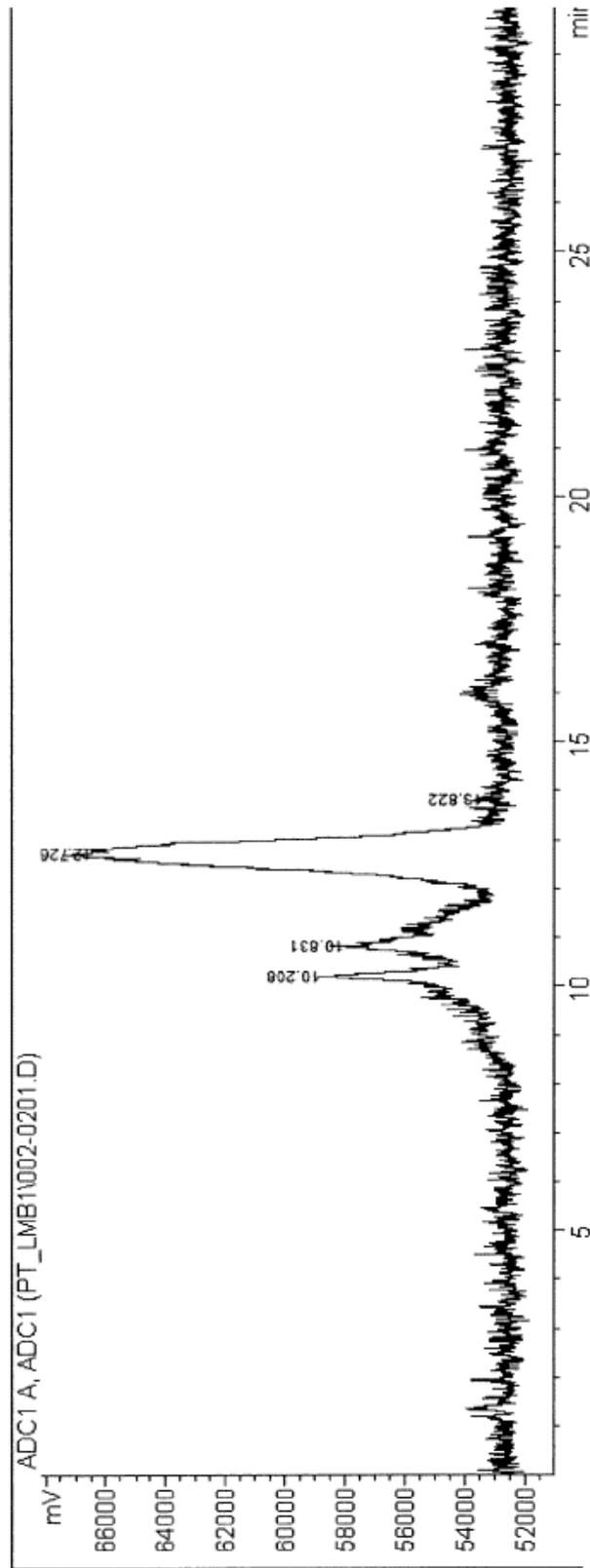
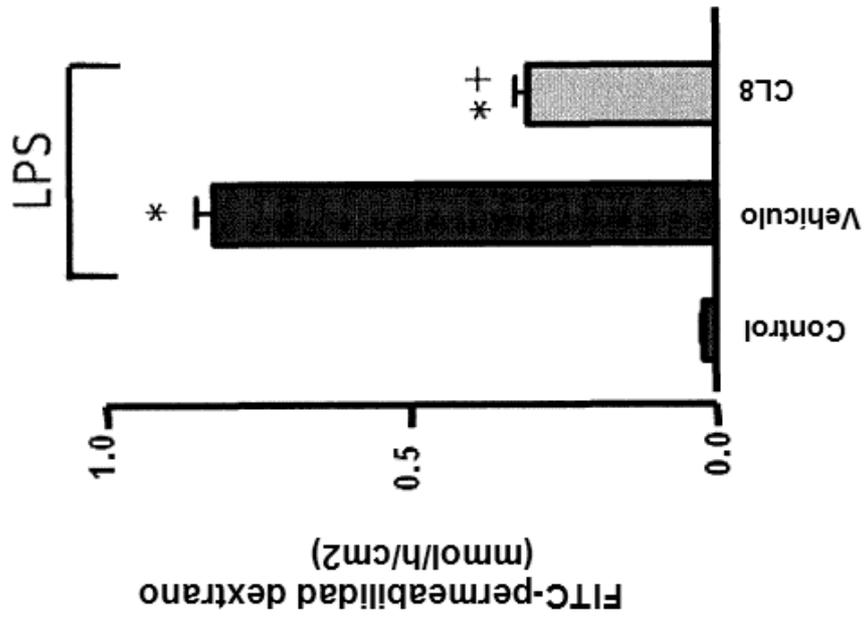
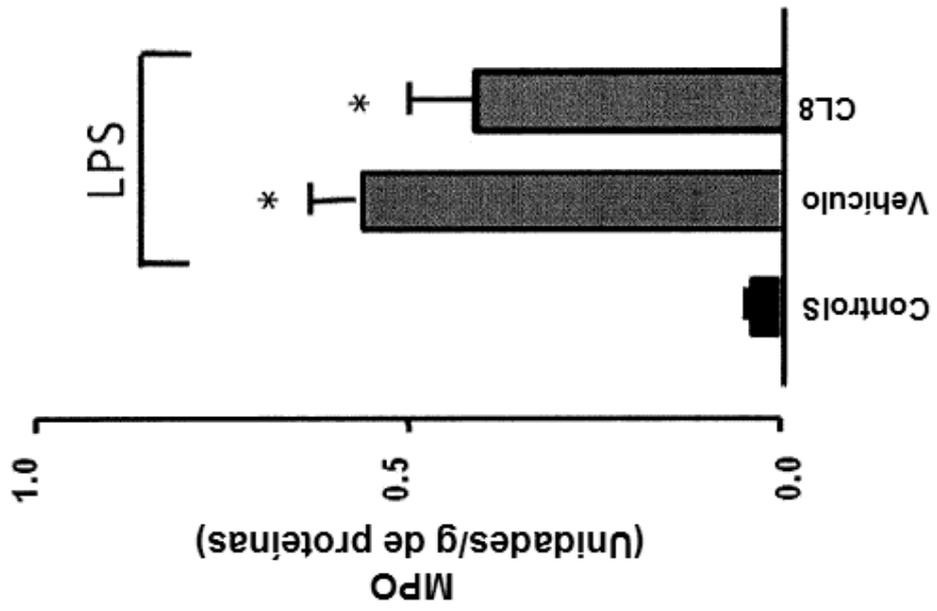


Figura 7



\*  $p < 0.05$  vs control

Figura 8



+  $p < 0.05$  vs vehiculo

Figura 9