

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



(10) ES	(11) NUMERO 444.076	(12) A 1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 3.1.76	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA 20 SET. 1977
(54) TITULO DE LA INVENCION UN METODO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE UREA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.		
(71) SOLICITANTE (S) MICHAEL MOON KI CHANG		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 1262 Barrington Avenue, Los Angeles, California, Estados Unidos de América.		
(72) INVENTOR (ES)		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

-2-

1 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a mezclas reactivas útiles para detectar y medir la urea.

La determinación de la urea ha sido importante
5 en la industria alimentaria, en la industria de los fertilizantes y en la química clínica. En la química clínica, la determinación de los niveles de urea en la sangre se usa rutinariamente como ayuda del diagnóstico en la evaluación de enfermedades nefríticas así como otros estados patógenos
10 que no son primariamente renales. El método de determinar la urea en la química clínica debería poder medir idealmente cantidades de microgramo de urea (debido al bajo nivel de urea en el suero) con rapidez, facilidad, exactitud y precisión. Sin embargo, los métodos del análisis de urea normalmente empleados en las industrias alimentaria y de fertilizantes son demasiado insensibles para las aplicaciones
15 de la química clínica.

Los tres métodos más ampliamente usados para la determinación de la urea en la química clínica son los métodos de ureasa de Nessler, de ureasa de Berthelot y de monoxima. En el método de ureasa de Nessler, la urea en el espécimen desconocido se hidroliza a dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco liberado se hace reaccionar con yoduro mercúrico (reactivo de Nessler) para dar una reacción de color fuerte que después se cuantifica colorimétricamente.
25 El método de ureasa de Berthelot es similar al método de ureasa de Nessler a excepción de que el amoníaco liberado se hace reaccionar con fenol, nitroprusida, e hipoclorito alcalino (reactivo de Berthelot) para dar la reacción colorada.
30 En el método de monoxima la urea en la muestra desco-

1 nocida se hace reaccionar directamente con monoxima para
dar un complejo coloreado fuerte en presencia de calor y
ácido.

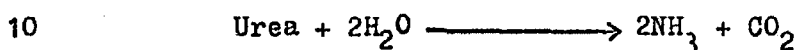
Todos estos métodos tienen distintos inconvenien-
5 tes. Incluyen desproteínización, remoción de amoníaco, cur-
vas de calibración alineal sobre la gama clínicamente útil,
tiempos prolongados de reacción y condiciones de reacción
elevadas. Los métodos enzimicos tienen la ventaja de ser
altamente específicos debido a la especificidad de la enzi-
10 ma ureasa para la urea. Sin embargo, tienen los inconvenien-
tes de que consumen mucho tiempo, son molestos de realizar,
emplean reactivos tóxicos, y son altamente sensibles a la
contaminación de amoníaco. El método de monoxima tiene la
desventaja de utilizar productos químicos tóxicos y de re-
15 querir elevadas temperaturas de reacción de hasta 100°C
para desarrollar el complejo de color además de que es menos
específico que los métodos de ureasa.

Otro método para la determinación de la urea im-
plica el uso de ureasa, un regulador y un colorante indica-
20 dor de pH. En dicho sistema de reacción, como dos moles
de NH_3 se forman por mol de CO_2 después de la hidrólisis
de la urea, la mezcla de reacción neta se hace alcalina.
El aumento neto de alcalinidad se determina visualmente con
con la ayuda de un colorante indicador de pH 1) titrimétri-
25 camente o 2) por comparación visual con cartas de color stan-
dard. El primer método tiene la desventaja de ser lento y
molesto. El segundo método tiene la desventaja de ser a lo
sumo semicuantitativo.

Se ha descubierto una nueva forma de determinar
30 la urea en fluidos biológicos que supera los inconvenientes

1 de los otros métodos citados anteriormente. Es decir, es
más simple y rápido de realizar que los métodos de ureasa
mencionados anteriormente, no requiere elevadas temperatu-
ras para la reacción, utiliza productos químicos inofensi-
5 vos, y es cuantitativo. El método se realiza convenientemente
a temperatura ambiente y toda la reacción se completa en cin-
co minutos.

En la mezcla de reacción la ureasa cataliza la
reacción:



Solamente el NH_3 liberado se detecta de una ma-
nera nueva y única.

RESUMEN DE LA INVENCION

En resumen, la presente invención se refiere a
15 una mezcla reactiva nueva que comprende ureasa, regulado-
res mezclados, como se describe más plenamente más adelante,
y un colorante indicador de pH en solución acuosa, o en
forma de polvo que se reconstituye con agua destilada antes
de su uso. También pueden estar presentes agentes estabili-
20 zadores. El fluido biológico que contiene urea, tal como la
orina, produce un incremento de pH proporcional a la canti-
dad de urea hidrolizada a amoníaco por la acción de la urea-
sa. El aumento de pH produce un cambio proporcional en la
absorción del colorante indicador de pH, cuyo cambio se
25 cuantifica en un espectrofotómetro o colorímetro adecuado.

Aunque el sistema general podría ser comprensi-
ble para cualquier experto en la materia, hacer el sistema
exacto, preciso, reproducible, repetible, y sólido dista
mucho de ser obvio como se evidencia por el hecho de que
30 dicho sistema nunca se usó para determinar la urea en fluidos

1 biológicos.

Los parámetros que se ajustaron cuidadosamente para hacer funcionar el sistema de la presente invención son la proporcionalidad lineal del cambio en absorbencia (en 5 un fotómetro) del colorante indicador con la cantidad de urea contenida en una muestra a analizarse y la relativa solidez (insensibilidad) del sistema a las perturbaciones de temperatura, concentración iónica y constituyentes moleculares que se encuentran normalmente en la realización de 10 ensayos de urea en laboratorios corrientes.

La linealidad del cambio en absorbencia con la concentración de urea se obtiene ajustando apropiadamente el pK del colorante indicador con el regulador de forma que el pK del colorante se aproxime al menos a uno de los pK 15 del regulador.

Una de las variables más difíciles de controlar en la mayoría de los laboratorios corrientes es las pequeñas fluctuaciones de temperatura de la mezcla de reacción. La absorbencia de un colorante indicador de pH cambiará con 20 un cambio de temperatura por las siguientes razones:

1) dilución de la concentración colorante debida al cambio de volumen del fluido reactivo con la temperatura, 2) disminución del pK del colorante debida al aumento de temperatura,

25 3) cambio del pK de los reguladores con el cambio de temperatura,

4) cambio de la concentración iónica del sistema reactivo debido al cambio de los coeficientes de actividad de las especies iónicas.

30 Para minimizar los efectos anteriores se ha creído

1 conveniente:

1) aumentar la concentración iónica del reactivo con sales neutras tales como NaCl, KCl, etc.

5 2) añadir un regulador o reguladores que aumenten en pH con un aumento de temperatura ($+ dpH/dT$) tales como pirofosfato y sales y ácidos del mismo.

3) finalmente añadir un regulador o reguladores que disminuyan en pH con un aumento de temperatura ($-dpH/dT$) tales como aminas substituidas y reguladores fenólicos substituidos.

En general, los reguladores mezclados y los colorantes indicadores de pH usados en la práctica de esta invención tienen aproximadamente el mismo pK.

15 La composición de la solución añadida al fluido biológico cuyo contenido de urea se determinará es generalmente la siguiente:

conc. de regulador - 1 a 100 milimoles/litro

conc. indicadora colorante - 0,05 a 2,0 milimoles/litro

conc. estabilizadora - 0 a 100 milimoles/litro

20 conc. enzimica - 0,1 a 10 unidades internacionales/ml.

Tres ml. de esta solución se usan usualmente para desde 0,01 a aproximadamente 1,0 ml. de sueros u otro fluido biológico.

25 En general, un objeto de la presente invención es facilitar una nueva mezcla reactiva.

Más particularmente, esta invención tiene como uno de sus objetos un procedimiento para usarse en la estimación de la urea en una solución acuosa, que incluye fluidos y tejidos corporales.

30 En otro aspecto más, un objeto de esta invención

1 es facilitar un artículo de fabricación que comprende una
nueva mezcla reactiva en forma empaquetada.

Estos y otros objetos y ventajas de esta invención
serán evidentes por la descripción detallada que sigue a
5 continuación.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

El material regulador particular que se emplea
en cualquier material de ensayo particular dependerá de la
reacción de ensayo particular a realizarse y los demás com-
ponentes del material de ensayo. Sin embargo, serán una
10 clase de reguladores que tengan un dpH/dT positivo. El ácido
pirofosfórico ($H_2P_2O_7$) y las sales iónicas positivas del
mismo tales como pirofosfato sódico, pirofosfato potásico,
y mezclas de los mismos, pueden darse como un ejemplo. Para
15 evitar aún más que el sistema se perturbe por la temperatura
la clase anterior de reguladores puede reforzarse con otros
reguladores que tengan un cambio negativo en pH con un cam-
bio positivo de temperatura. Las aminas substituidas y los
fenoles substituidos juntamente con sus sales pueden darse
20 a modo de ejemplo. Ejemplos de dichos reguladores son eti-
lendiamina, 1,3-diamino-2-hidroxiopropano, 1,3-diaminopropano,
glicilglicina, triacina, ácido 5,5-dietilbarbitúrico, tri-
tanolamina, tris(hidroximetil)aminometano, y mezclas de los
mismos. Los ejemplos de fenoles substituidos incluyen cre-
25 sol, clorofenol, bromofenol, fenilfenol y metoxifenol.

El colorante indicador puede ser cualquier compues-
to que cambie sus propiedades de absorción con un cambio de
pH, especialmente en la gama de pH neutro. A modo de ejemplo,
fenolsulfonftaleína, 2-metil-3-amino-6-dimetilaminofenacina,
30 o⁻cresolsulfonftaleína, cianina, 5,8-quinoleinaquinona-8-

1 hidroxil-5-quinolil-5-imida, y dibromotimolsulfonftaleína
son útiles en la práctica de esta invención.

Los estabilizadores tienen el efecto de estabi-
lizar e intensificar el color desarrollado y también de
5 evitar grandes variaciones de la concentración iónica en
el sistema reactivo después de la adición de la muestra.
Los estabilizadores evitan además la precipitación de pro-
teínas en la solución después de la adición de muestras de
materiales que contienen proteínas tales como suero y orina.
10 Se ha descubierto que los agentes secuestrantes tales como
ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sales neutras tales
como cloruro sódico y potásico fueron particularmente efec-
tivos a este respecto. Puede usarse cualquier colorímetro
o espectrofotómetro que transmita luz de aproximadamente
15 500-600 nm.

El nitrógeno de urea puede determinarse en el
plasma, suero, orina y otros fluidos biológicos según el
método de la presente invención sin desproteinización o re-
moción del amoníaco. Aunque la presente invención puede
20 aplicarse particularmente a la determinación del nivel de
urea en fluidos biológicos, tiene aplicación general a la
determinación del nivel de urea en cualquier fluido que con-
tenga urea. Debido a la especificidad de la ureasa para la
urea en la actualidad no se conoce ninguna sustancia que
25 resulte en valores de nitrógeno de urea falsos a excepción
de los reactivos, que desnaturalizan la enzima ureasa. Co-
mo la urea puede perderse mediante la acción bacterial, es-
pecialmente en muestras de orina, el espécimen debería con-
servarse apropiadamente por agentes antibacteriales o refri-
30 gerado.

1 En general, el método se realiza como sigue:

1. Háganse soluciones de 10, 20, 50, y 100 mg%
de nitrógeno de urea (21,43 mg., 42,87 mg., 107,2 mg. y
214,3 mg. de urea seca, A. R., por 100 ml. de agua destila-
5 da respectivamente).

2. Háganse pasar estas soluciones a través del
procedimiento de prueba como se describe más adelante.

3. Un gráfico de los resultados contra nitrógeno
de urea produce una línea recta en la mayoría de los espec-
10 trofotómetros hasta 200 mg.% de nitrógeno de urea, como se
muestra en el dibujo.

4. Sin aumentar o disminuir el volumen de la mues-
tra, es posible en la mayoría de los espectrofotómetros
medir desde 5 a 200 mg.% de nitrógeno de urea con facilidad.
15 Los ejemplos siguientes se presentan únicamente para ilus-
trar la invención, y no deben considerarse de ningún modo
como limitadores. Una cubeta de cualquier tamaño puede usar-
se en los ejemplos siguientes y por tanto diferentes volúme-
nes de muestra pueden usarse para cubetas de tamaño dife-
20 rente. Una cubeta de 3 ml se eligió para este ejemplo.

EJEMPLO I

1. Una solución que constaba de aproximadamente
10 mmol/litro de trietanolamina, 10 mmol/litro de pirofos-
fato, 10 mmol/litro de EDTA, 200 mmol/litro de cloruro só-
25 dico y 0,3 mmol/litro de fenolsulfonftaleína en agua desti-
lada se ajusta a un pH de 6 a 8 con hidróxido sódico o ácido
clorhídrico. Alternativamente una mezcla sólida que contenga
los ingredientes anteriores en cantidades apropiadas se
disuelve en agua destilada para dar la misma solución final.

30 2. Una muestra de ureasa se disuelve en una alif-

1 cuota de la solución final de la Fase 1 para dar una solución de aproximadamente 100 unidades internacionales de actividad de ureasa por ml a 25^oC.

3. Soluciones de urea, grado analítico, que contienen 10, 50 y 100 mg de nitrógeno de urea por 100 ml se hacen con agua destilada.

4. Pipetéense alícuotas de 2,8 ml. de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I a la cubeta vacía y las cubetas de muestra designadas a, b, c, y vacía.

10 5. Añádanse alícuotas de 0,1 ml. de la solución de urea de 10, 50, y 100 mg. por 100 ml de la Fase 3, Ejemplo I a las cubetas designadas a, b, c, respectivamente, y mézclese suavemente pero bien.

6. Regístrese la absorbencia inicial de las cubetas a, b, y c contra la cubeta vacía a 560 nM.

7. Añádanse alícuotas de 0,1 ml. de la solución de ureasa de la Fase 2, Ejemplo I, a las cubetas vacía y de muestra, mézclese suavemente pero bien y déjese reposar a temperatura ambiente durante al menos un minuto pero no más de 5 horas.

8. Regístrese la absorbencia final de cada tubo de muestra contra la cubeta vacía a 560 nM. Réstese la absorbencia inicial de cada cubeta de muestra de su valor de absorbencia final para obtener el cambio en absorbencia.

25 9. Un gráfico de la concentración de urea de las muestras contra el cambio en absorbencia resulta en una línea recta, como se ilustra en general en el dibujo.

10. La concentración de urea de las muestras desconocidas de fluido biológico puede obtenerse sometiendo las 30 muestras desconocidas a las Fases 1 a 8 descritas anterior-

1 mente y comparando los resultados obtenidos contra las so-
luciones con concentración de urea conocida.

En la mayoría de los laboratorios suele expresarse
la urea como nitrógeno de urea. Esto se debió al deseo de
5 comparar la cantidad de nitrógeno en la urea con la de
otros componentes incluidos en la categoría no-proteínica.
Como el peso molecular de la urea es 60 y contiene 2 átomos
de nitrógeno con un peso combinado de 28, un valor de nitró-
geno de urea puede convertirse a valor de urea multipli-
10 cando por 60/28 o 2,14.

Cálculo:

1. Réstese la absorbencia inicial de la absorbencia
final para obtener ΔA de la muestra y 50 mg% de nitró-
geno de urea tipo.

15
$$2. \text{ mg\% de nitrógeno de urea} = 50 \times \frac{\Delta A \text{ de muestra}}{\Delta A \text{ de tipo}}$$

3. mg% de urea = mg% de nitrógeno de urea x 2,14.

Cálculo de la muestra:

50 mg% de nitrógeno de urea tipo -

20	Absorbencia inicial	=	-0,04
	Absorbencia final	=	0,46
	ΔA	=	0,50
	Muestra - Absorbencia inicial	=	0,10
	Absorbencia final	=	0,20
25	ΔA	=	0,10

$$\text{BUN} = 50 \times \frac{10}{50} = 10 \text{ mg\%}$$

Gama normal (1) : Plasma o suero - 7 a 18 mg% de nitrógeno
de urea

(15 a 38 mg% de urea)

- 1 Orina - 12 a 20 gm. de nitrógeno de urea/24 hr.
(12 a 43 gm. de urea/24 hr)

EJEMPLO II

- 5 1. Una parte de la solución final de la Fase 2, Ejemplo I se mezcla con 29 partes de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I.
2. Pipetéense 2,9 ml de la solución de la Fase 3 a las cubetas designadas a, b, c, y vacía.
- 10 3. Añádanse alícuotas de 0,1 ml de las soluciones de 10, 50, y 100 mg. de nitrógeno de urea por 100 ml. de la Fase 3, Ejemplo I, a las cubetas de muestra denominadas a, b, y c, respectivamente, y mézclase suavemente pero bien. Se deja que las soluciones reposen a temperatura ambiente
- 15 (superior a 20°C) al menos durante un minuto pero no más de aproximadamente 5 horas.
4. Regístrese la absorbencia final de las cubetas designadas a, b, y c contra la cubeta vacía.
5. Un gráfico del cambio en absorbencia de cada
- 20 muestra contra la concentración de urea de las muestras resultará en una línea recta, como se ilustra en general en el dibujo.
6. La concentración de la urea en una muestra desconocida puede obtenerse haciendo pasar una muestra de fluido
- 25 biológico de contenido de urea desconocido a través de las Fases 1 a 4 descritas anteriormente en vez de las soluciones de urea conocidas, y comparando los resultados obtenidos con los resultados de la solución que contiene una cantidad conocida de urea. Esto se hace simplemente midiendo la absor-
- 30 bencia de la desconocida y leyendo la concentración de urea

1 que corresponde a la absorbencia medida sobre el gráfico lineal.

EJEMPLO III

5 Alternativamente, una mezcla sólida que contiene cantidades apropiadas de reguladores, colorantes indicadores, estabilizadores, y ureasa se disuelve en agua destilada para dar la misma solución final mencionada en la Fase 1 del Ejemplo II. De lo contrario, el procedimiento se realiza como se describe en el Ejemplo II.

10

EJEMPLO IV

1. Pipetéese una alícuota de 3 ml de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I a la cubeta vacía y 2,9 ml de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I a la cubeta de muestra.

15

2. Añádase 0,1 ml de la solución final de la Fase 2, Ejemplo I a la cubeta de muestra. Alternativamente añádanse 3,0 ml de la solución final de la Fase 1, Ejemplo II a la cubeta de muestra y 3 ml de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I a la cubeta vacía.

20

3. Añádanse alícuotas de 0,1 ml de 10 mg por 100 ml de nitrógeno de urea tipo de la Fase 3, Ejemplo I tanto a la cubeta vacía como a la de muestra y mézclese suavemente pero bien. Se deja que las soluciones reposen a temperatura ambiente al menos durante un minuto pero no más de 5 horas.

25

4. Regístrese la absorbencia de la cubeta de muestra contra la cubeta vacía.

5. Repítanse la Fases 1-4 anteriores con 50 mg y 100 mg por 100 ml de nitrógeno de urea tipo.

30 6. Un gráfico de la concentración de urea de las muestras contra el cambio en absorbencia resulta en una li-

1 nea recta.

7. La concentración de urea de las muestras desconocidas de fluido biológico puede obtenerse sometiendo las muestras desconocidas a las Fases 1 a 4 anteriores y comparando los resultados obtenidos contra las soluciones con concentración de urea conocida.

EJEMPLO V

1. Pipetéense alícuotas de 3 ml de la solución final de la Fase 1, Ejemplo I a las cubetas vacía y de muestra.

2. Añádanse 10 UI de ureasa seca o una cantidad apropiada de una solución de ureasa estabilizada concentradora tal como ureasa en glicerol de 50% a la cubeta de muestra y disuélvase agitando suavemente.

15 Las Fases 3 a 7 son idénticas al Ejemplo IV.

EJEMPLO VI

1. Alternativamente, una mezcla sólida que contiene cantidades apropiadas de reguladores, colorantes indicadores y estabilizadores se disuelve en agua destilada para dar la misma solución final citada en la Fase 1 del Ejemplo IV.

2. Alternativamente, mezclas sólidas que contienen cantidades apropiadas de reguladores, colorantes indicadores, estabilizadores y ureasa se disuelven en agua destilada para dar la misma solución final citada en la Fase 2 del Ejemplo IV.

Las Fases 3 a 7 son idénticas al Ejemplo IV.

EJEMPLO VII

1. Alternativamente una mezcla sólida que contiene cantidades apropiadas de reguladores, colorante indicadores,

1 y estabilizadores se disuelve en agua destilada para dar la misma solución final citada en la Fase I del Ejemplo V. De lo contrario, el procedimiento se realiza como se describe en el Ejemplo V.

5 En todos los casos en los que se ha especificado que la ureasa está en forma de solución, también puede usarse en forma de polvo o en forma de una solución altamente concentrada.

Habiendo descrito plenamente la invención, se pretende que se limite solamente por el alcance legal de las reivindicaciones adjuntas.

En resumen, la patente de invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1.- Un método para determinar el nivel de urea en fluidos biológicos que comprende:

a) añadir a un espécimen de dicho fluido, reguladores mezclados, un colorante indicador, y ureasa, en el que dichos reguladores mezclados comprenden al menos un regulador que aumenta en pH cuando aumenta la temperatura y al menos otro regulador que disminuye en pH cuando aumenta la temperatura, y

b) medir la absorbencia de dicha solución precisamente después de que dicha ureasa haya catalizado la conversión total de la urea en el fluido que contiene urea a amoníaco.

2.- Un método según la reivindicación 1, que comprende:

añadir además estabilizadores.

30 3.- Un método según la reivindicación 1, en el

1 que dichos reguladores colorante indicador, y ureasa se añaden
a dichos especímenes y al menos otros dos especímenes de igual
volumen, uno de los cuales no contiene urea o contiene una can-
tidad conocida pero diferente de urea, se mide la absorbencia
5 de las tres soluciones después de la liberación de amoníaco,
se marcan los resultados en forma de gráfico lineal y se lee
el contenido de urea de dicho espécimen de fluido que contie-
ne urea a partir de dicho gráfico.

4.- Un método según la reivindicación 1, en el
10 que la absorbencia de los especímenes se mide antes de la adi-
ción de la ureasa y nuevamente después de que la ureasa haya
liberado el amoníaco, el cambio de absorción de cada especí-
men se marca contra el contenido de urea de los especímenes
de contenido de urea conocido, y se lee el contenido de urea de
15 dicho espécimen de fluido que contiene urea a partir de dicho
gráfico.

5.- Un método según la reivindicación 1 en el
que dicho regulador con un dpH/dT positivo es un pirofosfato.

6.- Un método según la reivindicación 1 que com-
20 prende añadir solamente un regulador.

7.- Un método según la reivindicación 6, en el
que el regulador es un pirofosfato.

8.- Un método según la reivindicación 1, en el
que dicha composición está en la forma de una solución acuosa
25 que contiene de 1 a 100 milimoles por litro de regulador,
de 0,05 a 2.0 milimoles por litro de colorante indicador, y
de 0,1 a 10 unidades internacionales por mililitro de ureasa.

9.- Un método según la reivindicación 2, en el
que dicha composición contiene además desde 0 a 100 milimoles
30 por litro de estabilizador.

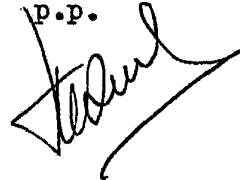
1 10.- Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN METODO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE UREA EN FLUIDOS BIOLÓ-
GICOS.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de diecisiete pági-
nas mecanografiadas, y dibujos adjuntos.

Madrid, 3 de enero de 1.976

BERNARDO UNGRIA

P.P.



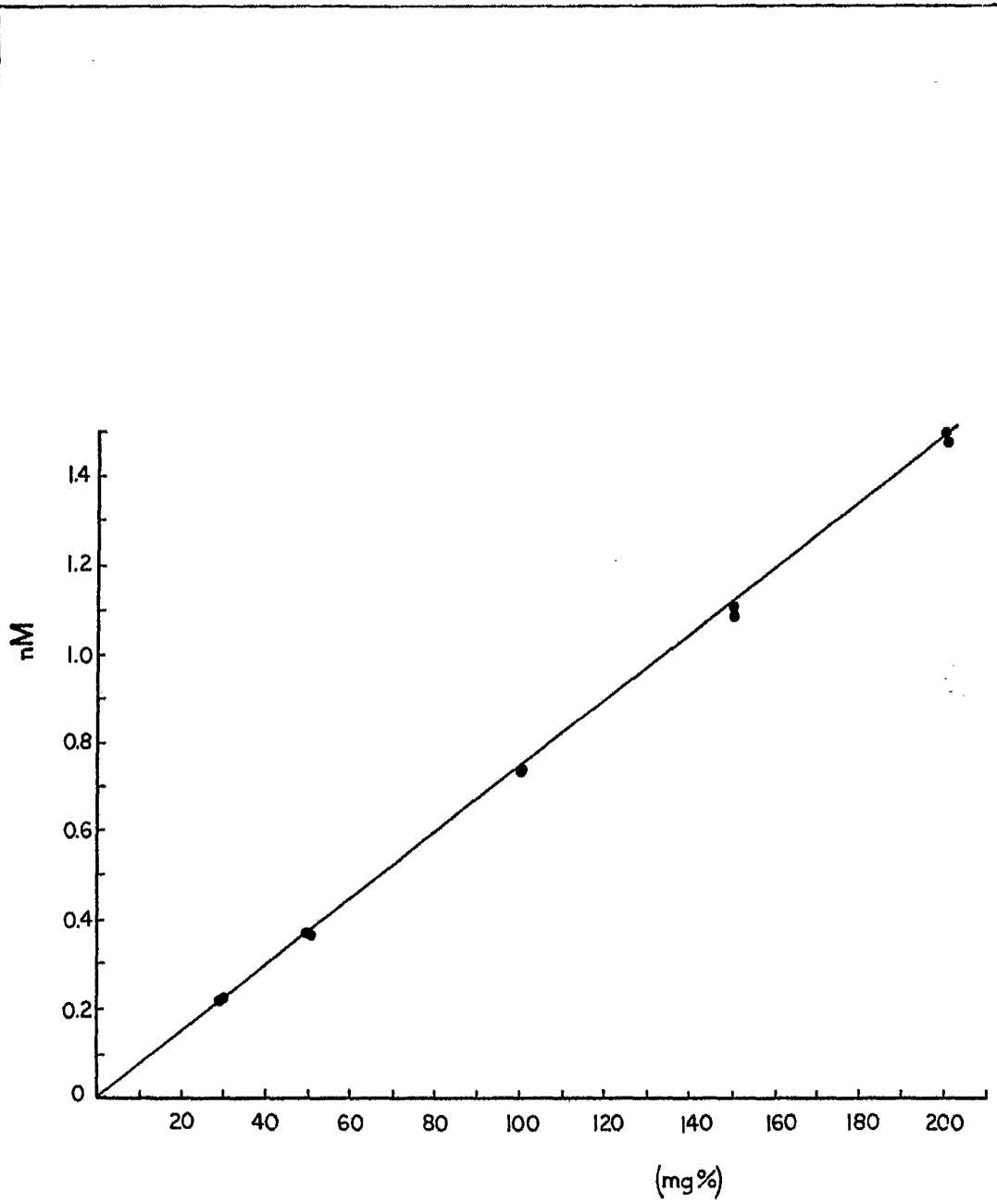
10

15

20

25

30



ESCALA VARIABLE
Madrid, 3 Enero de 1976
BERNARDO HUNGRIA
P.P.