

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 432**

51 Int. Cl.:

A61K 31/385 (2006.01)

A61K 31/621 (2006.01)

A61K 31/625 (2006.01)

A01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2015 PCT/US2015/015380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2015 E 15749116 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3104856**

54 Título: **Método para cebar plantas contra factores de estrés abiótico**

30 Prioridad:

12.02.2014 US 201461939064 P
02.06.2014 US 201462006295 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2020

73 Titular/es:

**RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY
UNIVERSITY OF NEW YORK (50.0%)
230 West 41st Street 7th Floor
New York, New York 10036, US y
CYPRUS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KASHFI, KHOSROW y
FOTOPOULOS, VASILEIOS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 775 432 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

Método para cebar plantas contra factores de estrés abiótico

Antecedentes de la invención

5 Los factores de estrés abiótico tales como la sequía, la salinidad y el calor representan elementos clave que limitan la productividad agrícola en todo el mundo. Un examen minucioso de la comunicación de planta a planta en la naturaleza ha revelado el desarrollo de estrategias únicas de las plantas para responder al estrés abiótico, siendo uno de los más interesantes a través del cebado para mejorar las respuestas de defensa. El proceso de cebado implica la exposición previa a un factor de estrés biótico o abiótico que hace que una planta sea más resistente a la exposición futura. El cebado también se puede lograr mediante la aplicación de compuestos naturales o sintéticos que actúan como transductores de señalización, "activando" el sistema de defensa de la planta. Aunque el fenómeno se conoce desde hace muchos años, solo recientemente se ha sugerido que el cebado puede mejorar la resistencia de los cultivos al estrés ambiental en el campo.

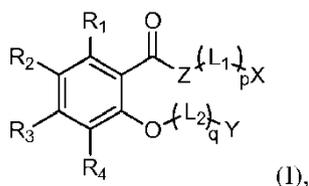
10 Existe la necesidad de nuevos agentes de cebado que funcionen mejor para preparar las plantas para la exposición a factores de estrés abiótico.

15 También existe la necesidad de nuevos medios rentables para promover el crecimiento de las plantas desde el momento de la siembra hasta la madurez de una planta.

20 El documento "Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development" (JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 62, no. 10, 28 de febrero de 2011, páginas 3321-3338) divulga el papel del ácido salicílico en el crecimiento de las plantas y desarrollo. El documento "Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (Cynodon dactylon (L.) Pers.)" (PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 74, páginas 99-107) divulga el efecto sinérgico de SNP+NaHS en una planta que está bajo estrés de cadmio. El documento "Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars" (JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, 2011, páginas 807-815) divulga el efecto del ácido salicílico (también llamado aspirina) en la fotosíntesis bajo estrés salino.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un método para reducir el daño celular a una planta que incluye el tratamiento de la planta con una composición que incluye un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a una fórmula I de núcleo derivada de aspirina:



en la que:

cada uno de p y q, independientemente, es 0 o 1;

35 cada uno de L₁ y L₂, independientemente, es un enlazador, siendo el enlazador -C(O)-, -(CH₂)_m-, -(CH₂)_m-O-, -(CH₂)_m-C(O)-, -(CH₂)_m-C(O)O-, -(CH₂)_m-OC(O)O-, -C(O)-(CH₂)_m-O-, -C(O)-(CH₂)_m-C(O)-, -OC(O)-(CH₂)_m-O-, -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)-, o -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)O-, en el que m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7;

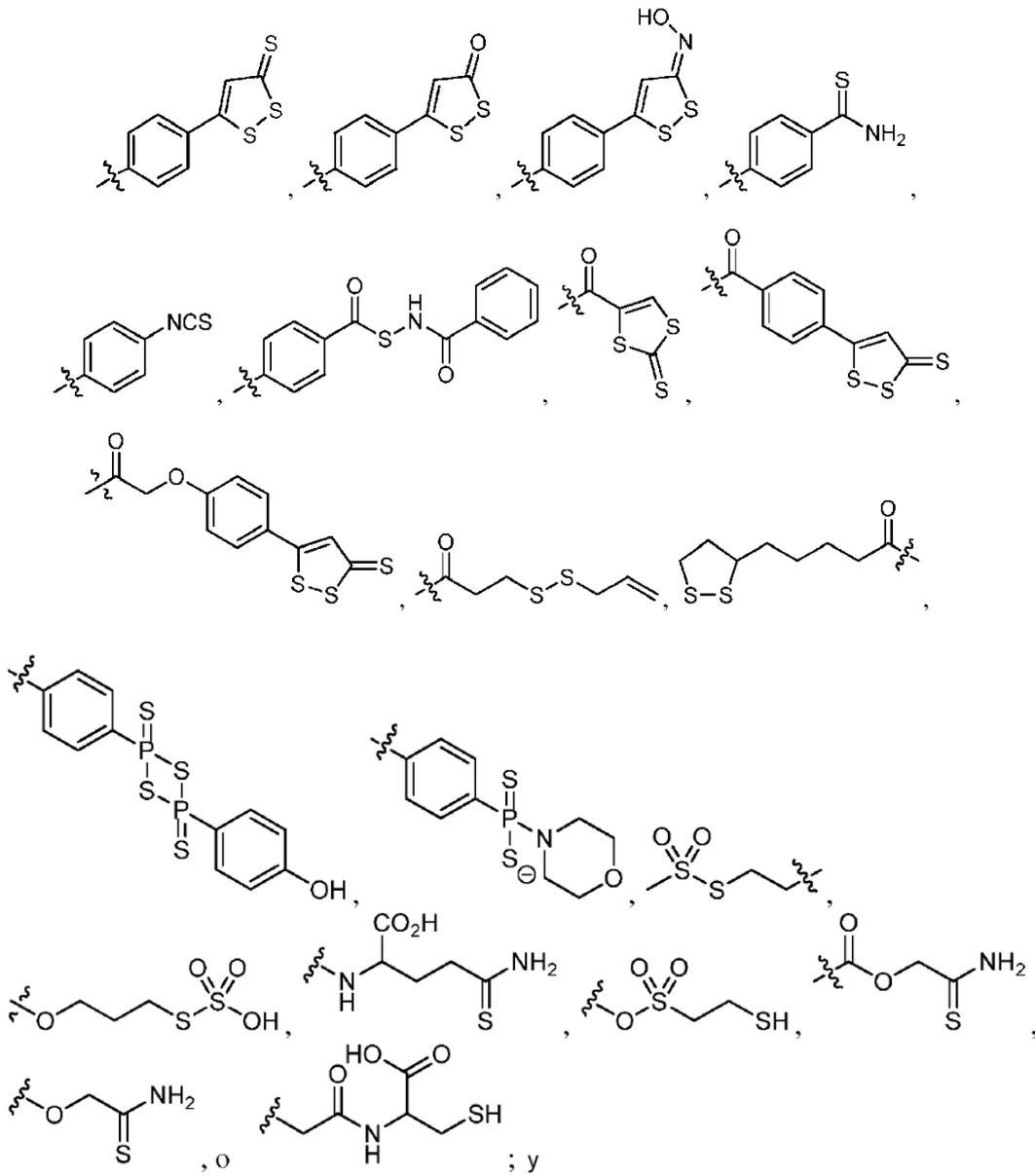
X es una unidad estructural liberadora de H₂S o una unidad estructural liberadora de NO;

Y es una unidad estructural liberadora de NO o una unidad estructural liberadora de H₂S, siempre que X y Y no sean simultáneamente unidades estructurales liberadoras de H₂S o unidades estructurales liberadoras de NO;

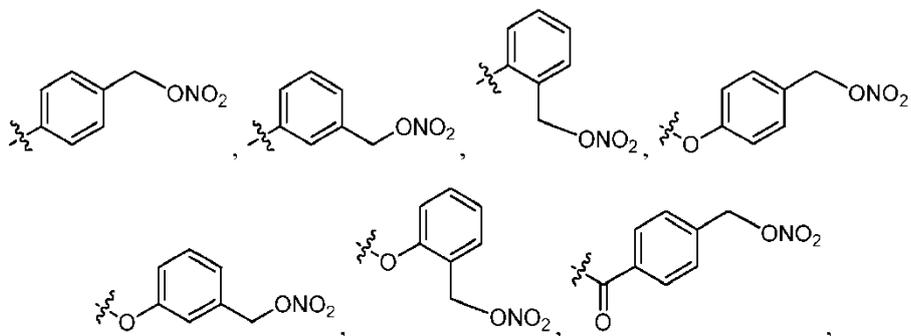
Z es O o NH; y

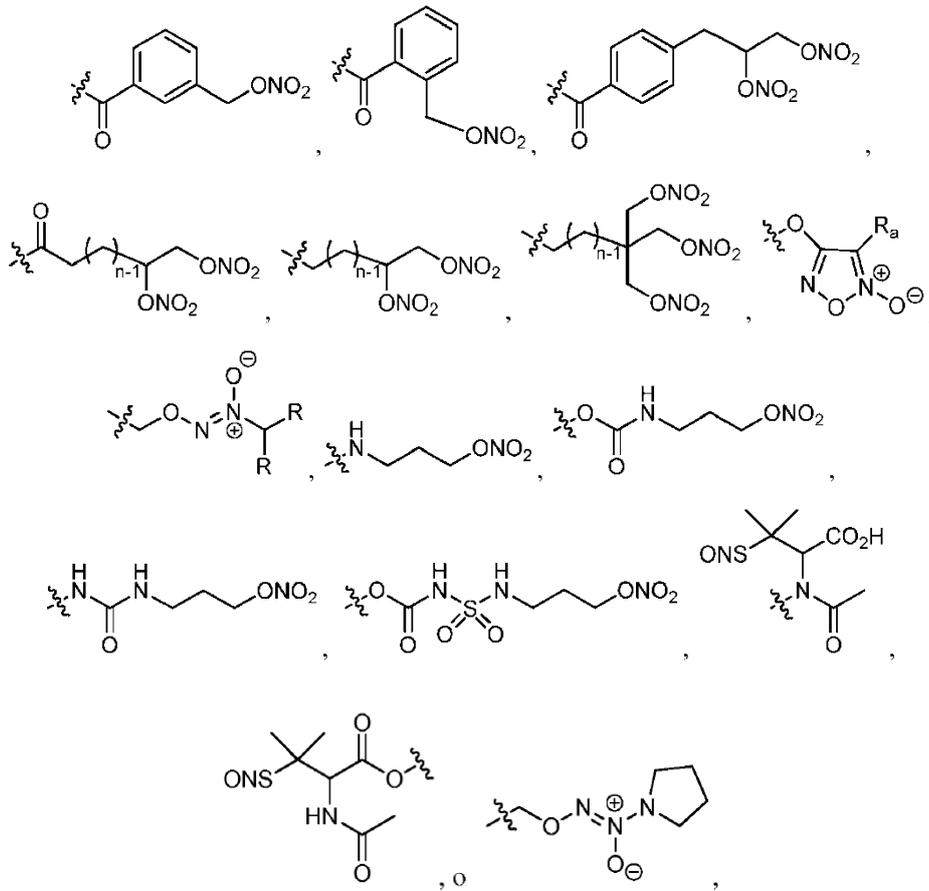
40 cada uno de R₁, R₂, R₃, y R₄, independientemente, es H, halo, alquilo C₁-C₁₀, o N(R)₂, en el que R es H o alquilo C₁-C₁₀,

y en la que la unidad estructural liberadora de H₂S es



5 la unidad estructural liberadora de NO es $-\text{NO}$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$,

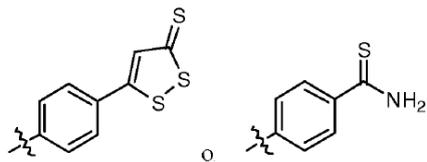




5

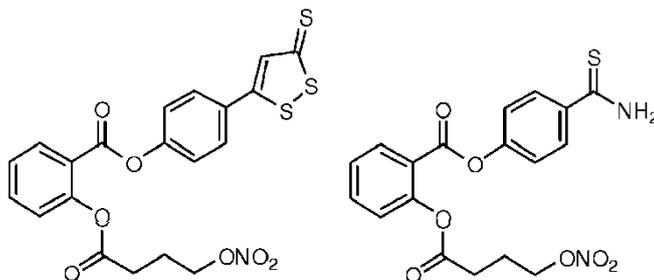
en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; R_a es H, alquilo C₁-C₁₀, arilo, S(O)₂-arilo, CN, o CON(R_b)₂; y cada uno de R_b, independientemente, es H o alquilo C₁-C₁₀.

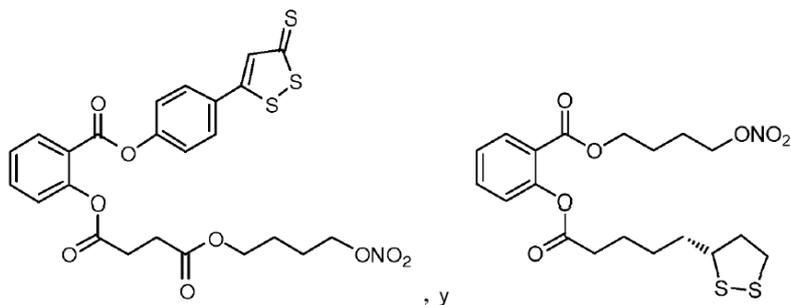
En una realización preferida, X es



10 Y es preferiblemente -C(O)-(CH₂)_n-ONO₂.

Los compuestos preferidos de la invención incluyen:





5 La invención también se refiere a un método para cebar una planta contra factores de estrés abiótico seleccionados de sequía, salinidad, calor o combinaciones de los mismos, incluido el tratamiento de la planta con una composición que incluye un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina como se define aquí anteriormente.

También se divulga un método para promover el crecimiento de una planta que incluye el tratamiento de la planta con una composición que incluye un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina o NOSH. Los compuestos preferidos se describen anteriormente.

10 Descripción de los dibujos

Fig. 1 Daño celular indicado por el contenido de MDA de la hoja en plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH/NOSH-aspirina (disuelto en 70% (v/v) MetOH) (n=3).

Fig. 2 Daño celular indicado por el contenido de MDA de la hoja en plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH-aspirina disuelto en 30% (v/v) MetOH (n=3).

15 Fig. 3 Síntomas de toxicidad (manifestados como clorosis) resultantes del tratamiento con 20% de acetona (a) o 20% de DMSO (b) en hojas de plantas de *M. truncatula*.

Fig. 4 Contenido de peróxido de hidrógeno en hojas de plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH/NOSH-aspirina (disuelto en 70% (v/v) MetOH) (n=3).

20 Fig. 5 Contenido de peróxido de hidrógeno en hojas de plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH-aspirina (disuelto en 30% (v/v) de MetOH) (n=3).

Fig. 6 Contenido de prolina en hojas de plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH-A (disuelto en 30% (v/v) de MetOH) (n=3).

25 Fig. 7 Niveles de expresión génica relativa a RT-PCR en Tiempo Real en hojas de plantas de *M. truncatula* estresadas por la sequía pretratadas con NOSH-A (disuelto en 30% (v/v) MetOH), en comparación con muestras estresadas por la sequía). CAT=catalasa, Cu/ZnSOD=Cu/Zn superóxido dismutasa, FeSOD=Fe superóxido dismutasa, cAPX=ascorbato peroxidasa citosólica, P5CS y P5CR son enzimas principales involucradas en la biosíntesis de prolina.

Fig. 8 Representación esquemática de la configuración experimental.

Fig. 9 Fenotipos de grupos de muestras en el día 6 después de la imposición de estrés por sequía.

30 Fig. 10 Fenotipos de grupos de muestras en el día 7 (6 días de estrés por sequía + 1 día de rehidratación/recuperación).

Fig. 11 Fenotipos de grupos de muestras en el día 13 (después de dos oleadas de estrés por sequía).

Fig. 12 Fluorescencia de clorofila y niveles de conductancia estomática de las plantas a los 6 d (estrés por sequía) y 7 d (recuperación).

35 Fig. 13 Daño celular indicado por el contenido de MDA de la hoja en plantas de *M. sativa* en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH/NOSH-aspirina.

Fig. 14 Contenido de peróxido de hidrógeno (A) y óxido nítrico (B) en hojas de plantas de *M. sativa* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento de NOSH/NOSH-aspirina a los 6 d (estrés por sequía) y 7 d (recuperación).

Fig. 15 Contenido de prolina en hojas de plantas de *M. sativa* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH/NOSH-aspirina a los 6 d (estrés por sequía) y 7 d (recuperación).

Fig. 16 Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD; A) y catalasa (CAT; B) en hojas de plantas de *M. sativa* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento de NOSH/NOSH-aspirina a los 6 d (estrés por sequía) y 7 d (recuperación).

Fig. 17 Expresión génica relativa a RT-PCR en Tiempo Rreal en hojas de plantas de *M. sativa* estresadas por la sequía en presencia o ausencia de pretratamiento con NOSH/NOSH-aspirina a los 6 d (estrés por sequía) y 7 d (recuperación) en comparación con plantas de control. NR=nitrato reductasa, GST17=glutación S-transferasa 17, Cu/ZnSOD=Cu/Zn superóxido dismutasa, FeSOD=Fe superóxido dismutasa, APX=ascorbato peroxidasa citosólica, PIP=aquaporina.

Fig. 18 Serie de hojas de plantas individuales tratadas con agua o acetona al 20% (v/v).

Fig. 19 Serie de hojas de plantas individuales tratadas con 10 µM de NOSH.

Fig. 20 Serie de hojas de plantas individuales tratadas con 10 µM de NOSH-A.

Fig. 21 Serie de hojas de plantas individuales tratadas con NOSH o NOSH-A 100 µM.

Fig. 22 Análisis del área foliar de plantas de control y plantas tratadas con NOSH o NOSH-A 10 µM. El área de roseta indica el área total de la hoja por planta (las hojas forman una roseta en la base de la planta; cualquier hoja que pueda aparecer en el tallo floreciente no se incluye en la roseta, aunque las hojas normalmente no se desarrollan a lo largo del tallo en 23 DAS cuando la toma de muestras).

Descripción detallada

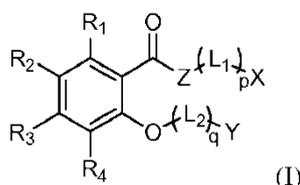
La invención se refiere a reducir el daño celular a una planta que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina. La planta puede ser cualquier tipo de planta. Las plantas preferidas son plantas terrestres, ya que se ven más afectadas negativamente por factores de estrés abiótico tales como la sequía, la salinidad y el calor.

Se proporciona un método para reducir el daño celular a una planta que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina como se define en la reivindicación 1.

También se proporciona un método para cebar una planta contra factores de estrés abiótico, en el que el factor de estrés abiótico es sequía, salinidad, calor o combinaciones de los mismos, que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina como se define en la reivindicación 2.

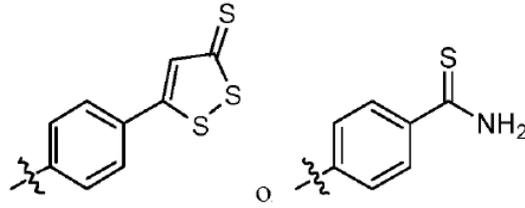
Los compuestos que contienen una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina son conocidos en la técnica. Véase la publicación de patente internacional No. WO 2013/025790.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto es de fórmula (I):

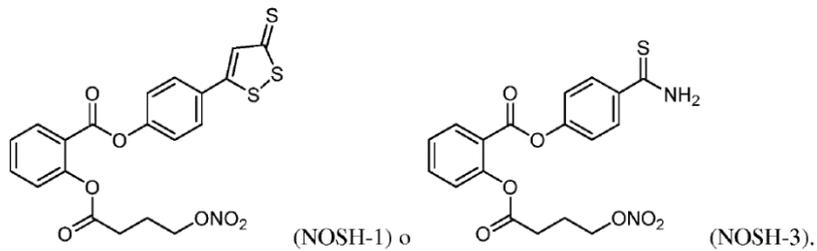


en la que cada uno de p y q, independientemente, es 0 o 1; cada uno de L₁ y L₂, independientemente, es un enlazador, siendo el enlazador -C(O)-, -(CH₂)_m-, -(CH₂)_m-O-, -(CH₂)_m-C(O)-, -(CH₂)_m-C(O)O-, -(CH₂)_m-OC(O)O-, -C(O)-(CH₂)_m-O-, -C(O)-(CH₂)_m-C(O)-, -OC(O)-(CH₂)_m-O-, -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)-, o -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)O-, en el que m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; X es una unidad estructural liberadora de H₂S o una unidad estructural liberadora de NO; Y es una unidad estructural liberadora de NO o una unidad estructural liberadora de H₂S, siempre que X y Y no sean simultáneamente unidades estructurales liberadoras de H₂S o unidades estructurales liberadoras de NO; Z es O o NH; y cada uno de R₁, R₂, R₃, y R₄, independientemente, es H, halo, alquilo C₁-C₁₀, o N(R)₂, en el que R es H o alquilo C₁-C₁₀.

En un subconjunto de los compuestos de fórmula (I), X puede ser

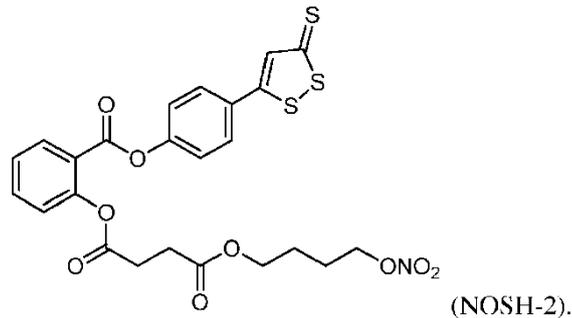


En algunas realizaciones de tales compuestos, Y puede ser $-C(O)-(CH_2)_n-ONO_2$, y p y q pueden ser 0. Ejemplos de tales compuestos son

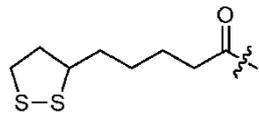


5 NOSH-1 también se denomina en este documento como NOSH-aspirina, NOSH-A o NOSHA.

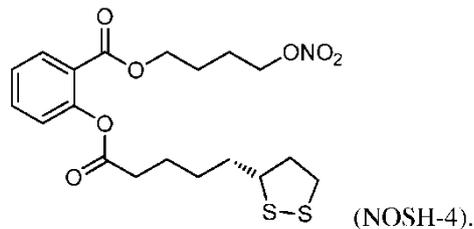
En algunas realizaciones de tales compuestos, Y puede ser $-(CH_2)_n-ONO_2$, p puede ser 0, q puede ser 1, y L_2 puede ser $-OC(O)-(CH_2)_m-C(O)-$. Un ejemplo de tal compuesto es



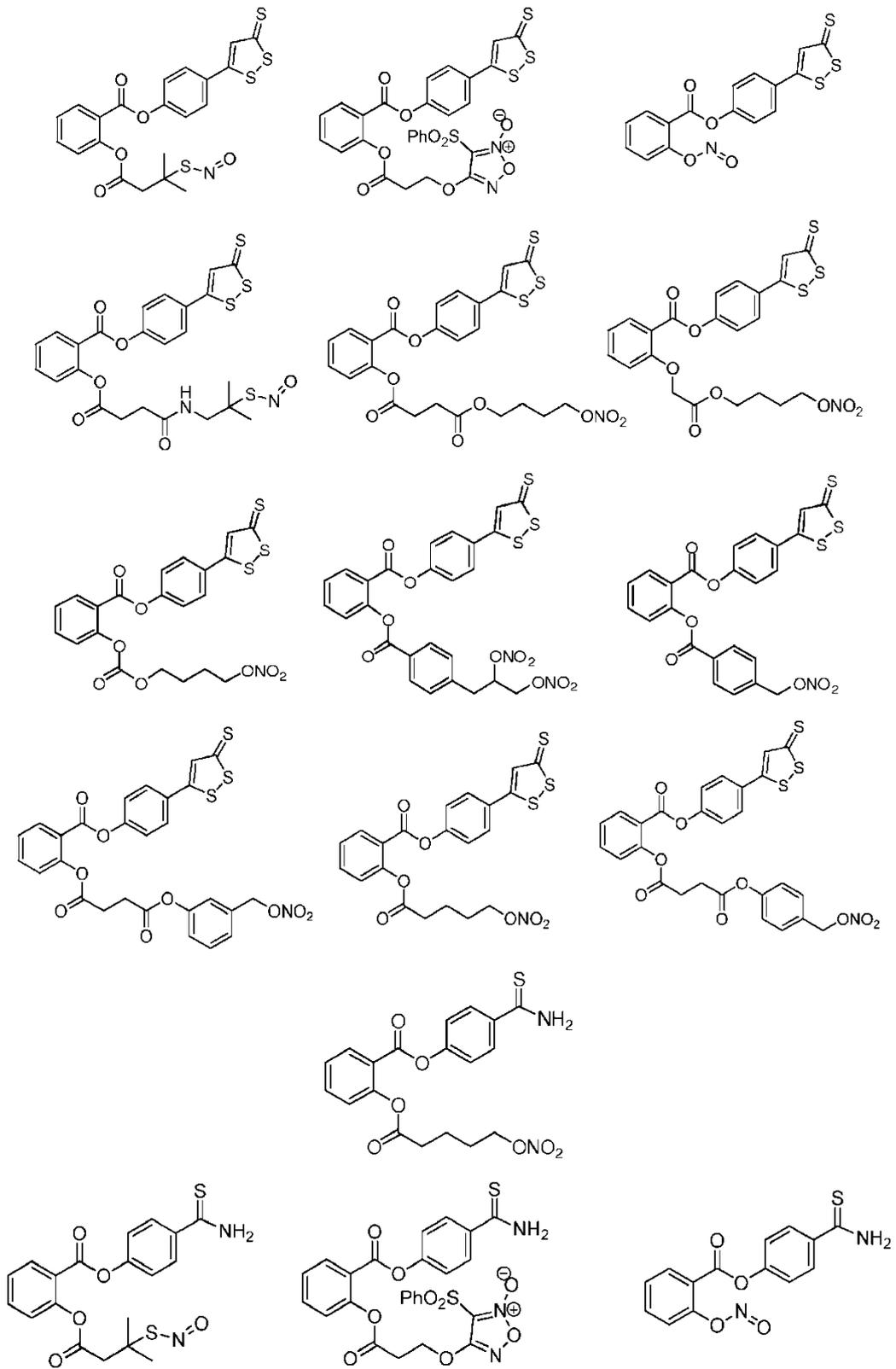
10 En otro subconjunto de los compuestos de fórmula (I), X puede ser $-C(O)-(CH_2)_n-ONO_2$. En tal compuesto, Y puede ser

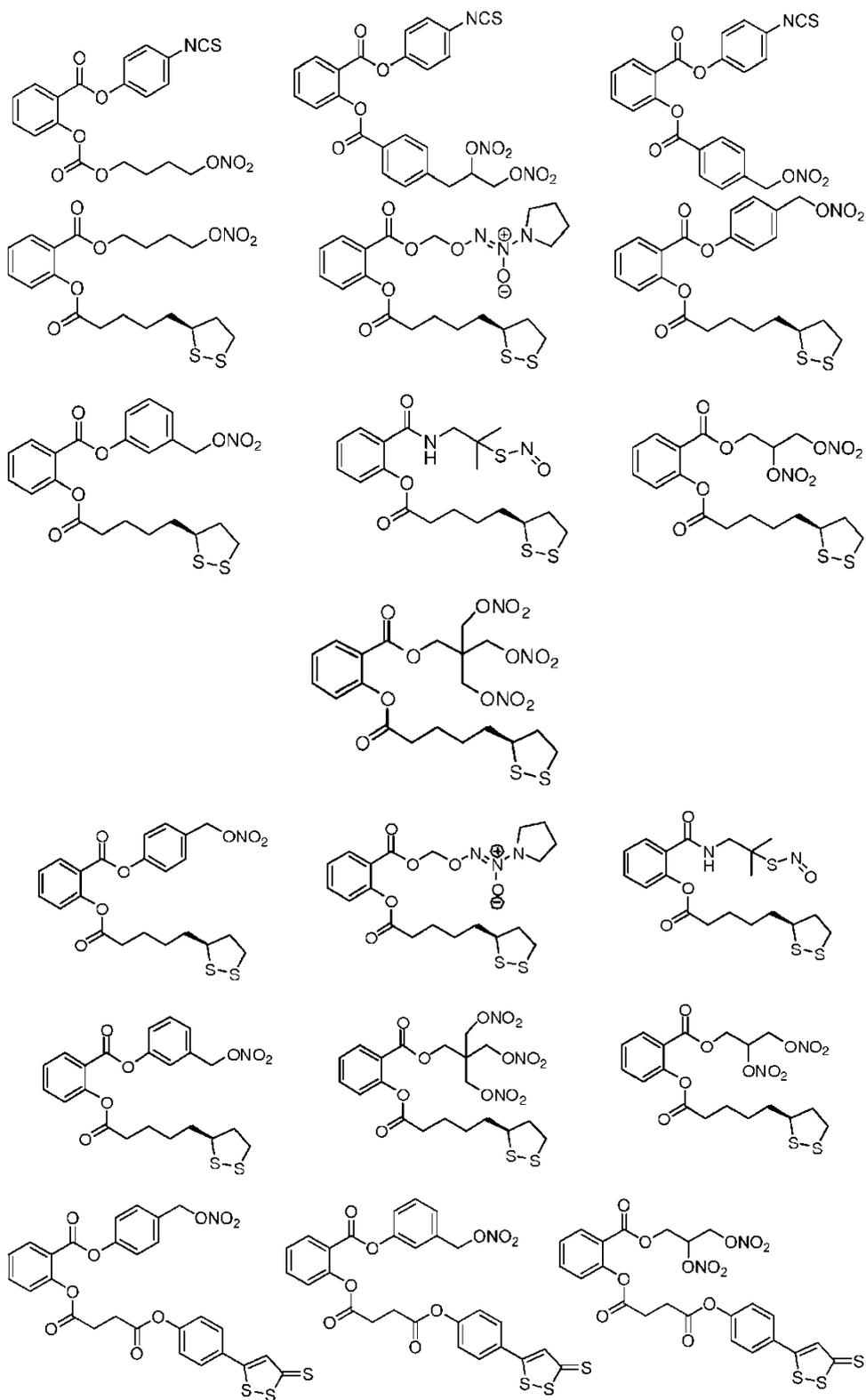


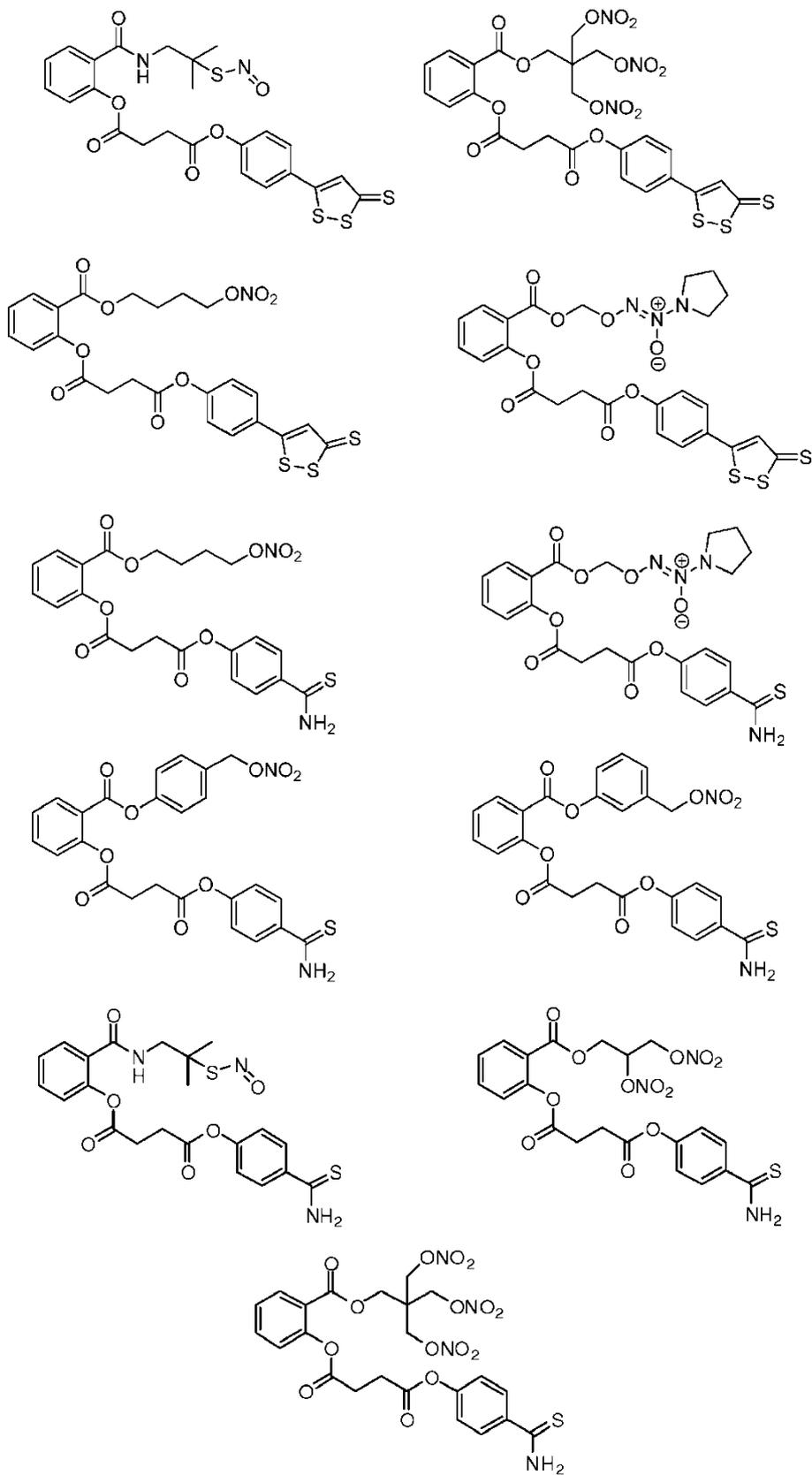
y p y q pueden ser 0. Un ejemplo de tales compuestos es

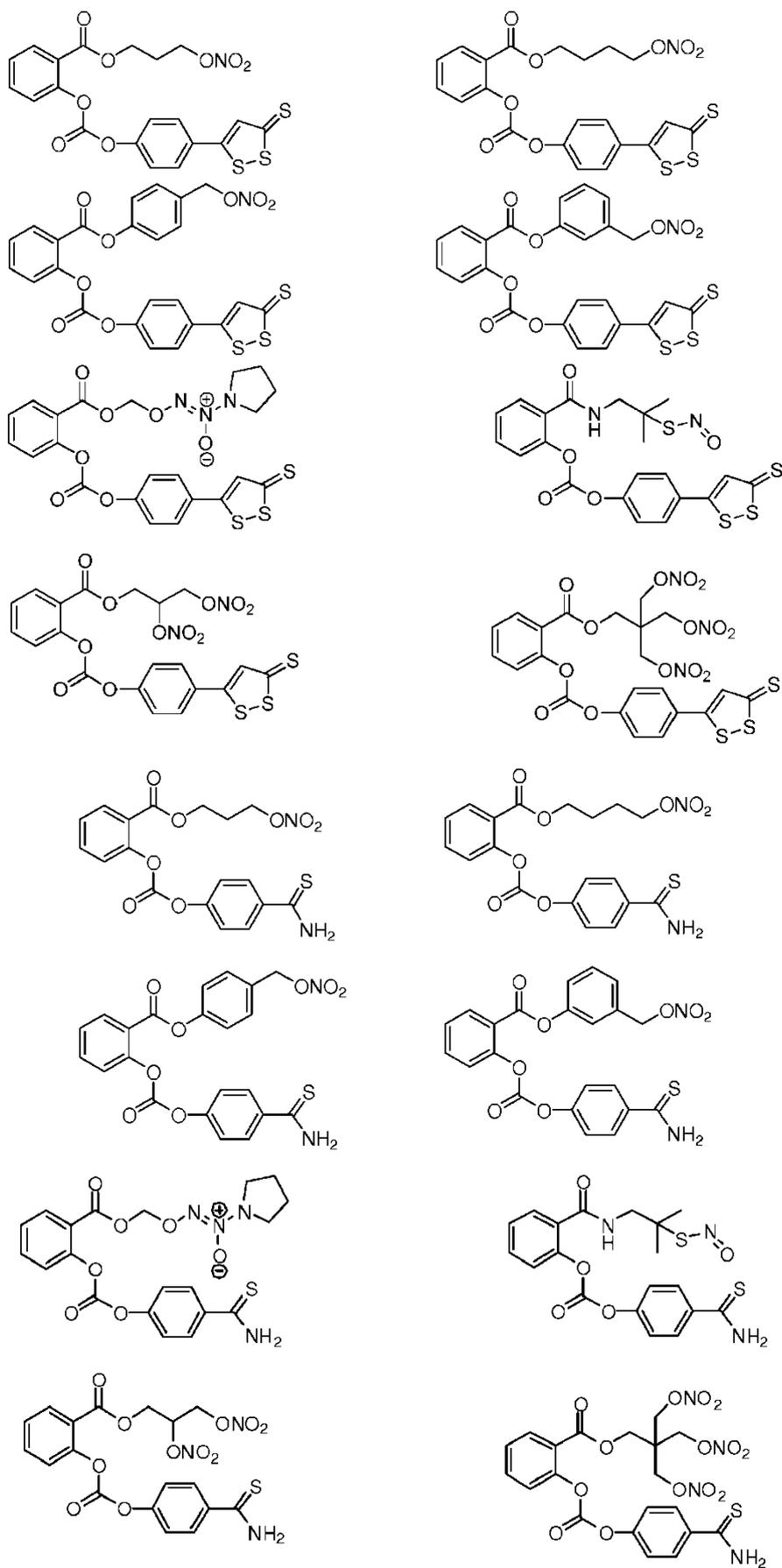


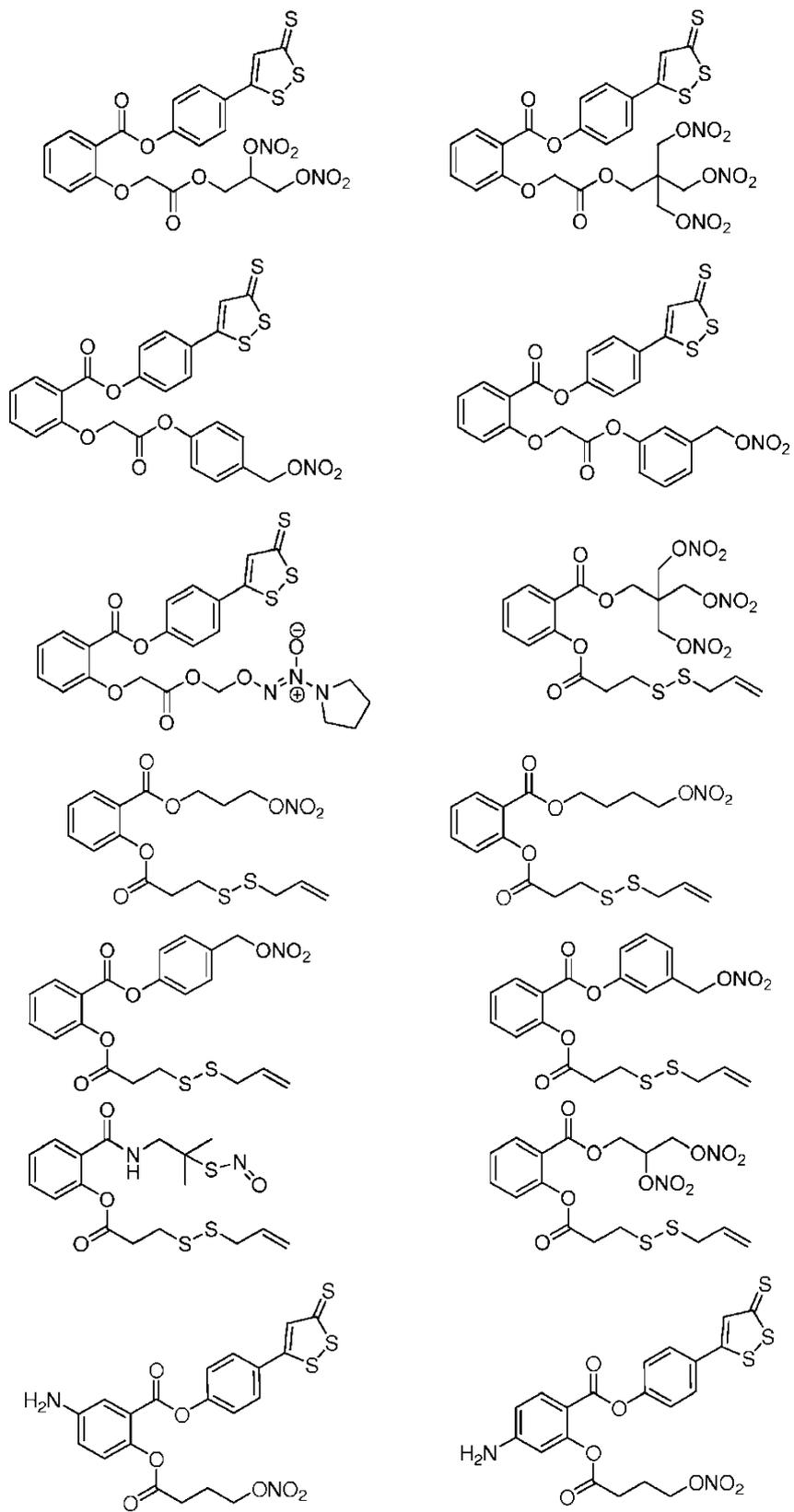
Otros ejemplos de los compuestos de fórmula (I) incluyen:

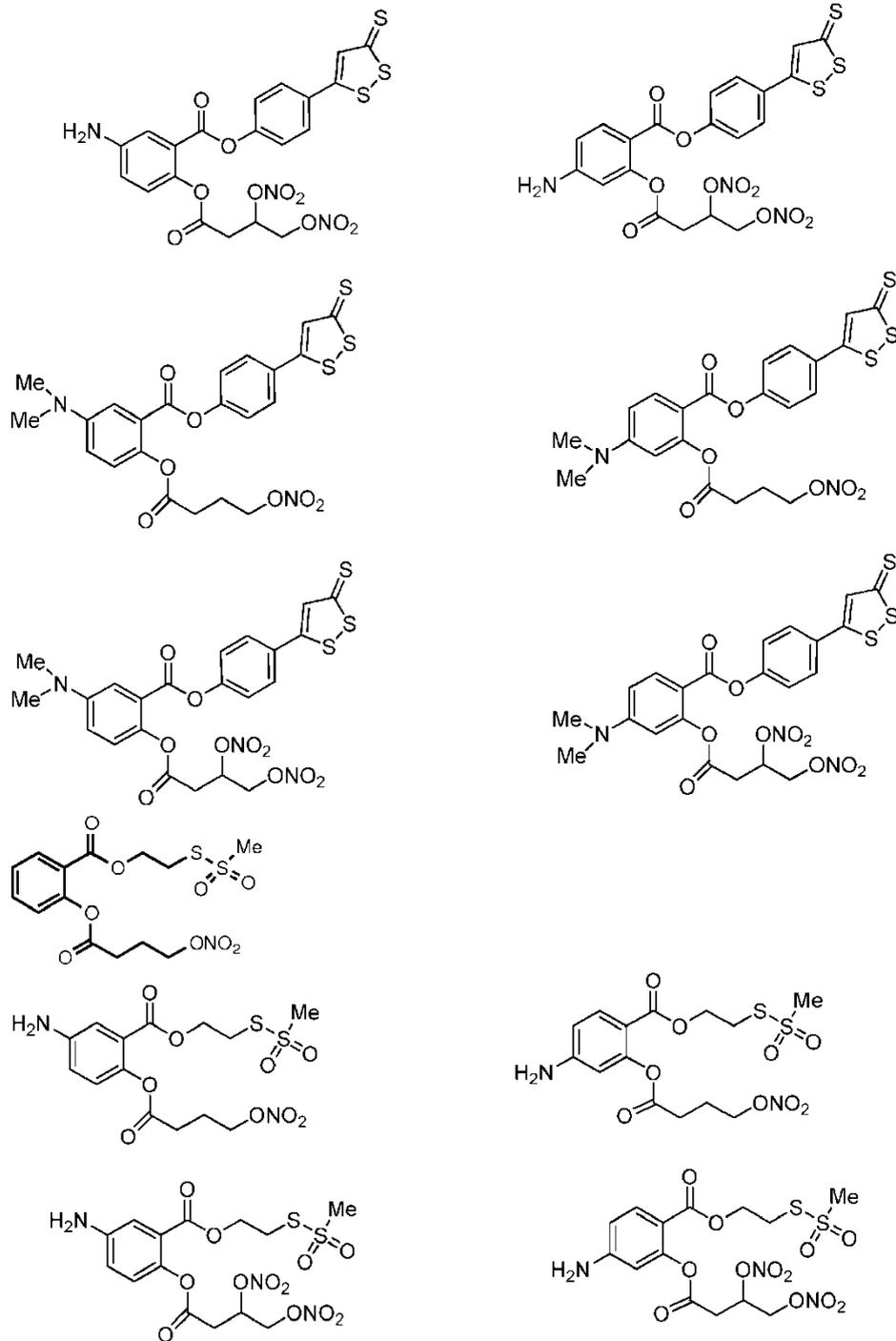






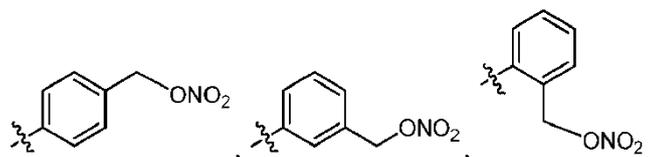


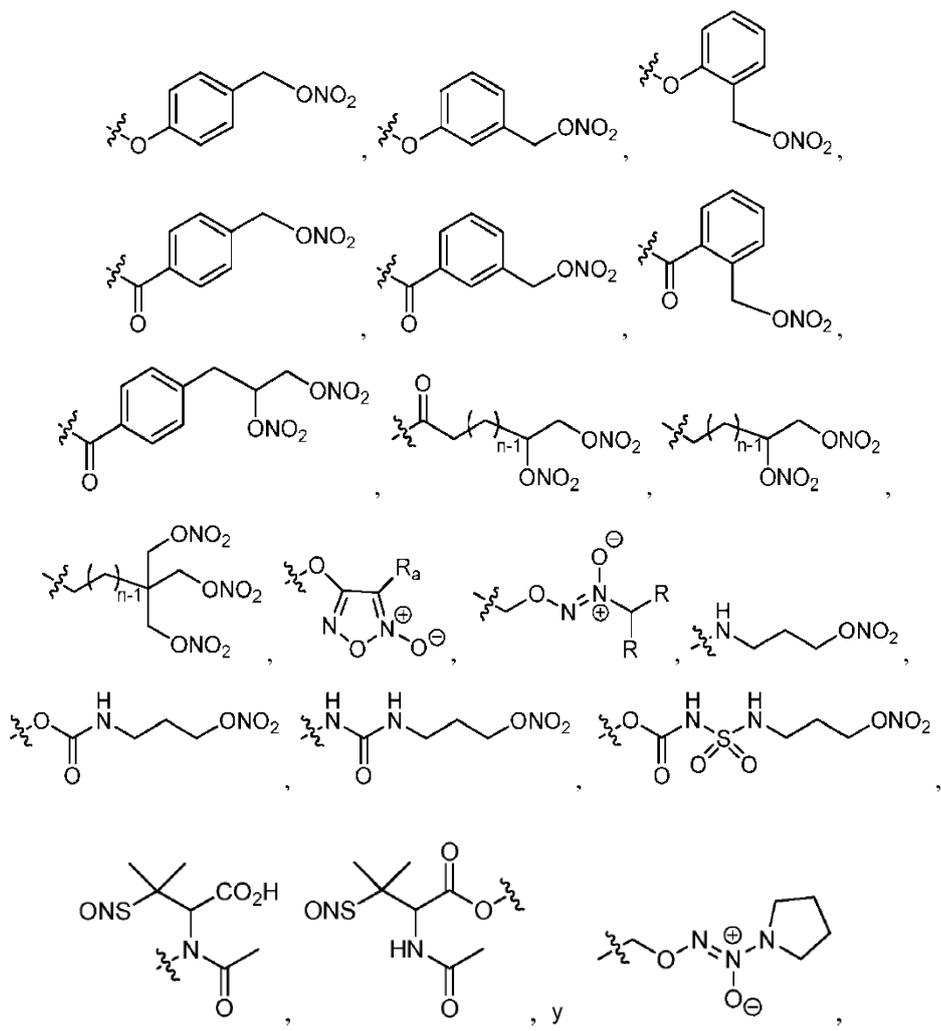




- 5 Como se usa en el presente documento, "una unidad estructural liberadora de NO" se refiere a una unidad estructural que puede escindirse de un compuesto original para generar NO bajo condiciones fisiológicas después de que el compuesto original se administra a un paciente. De acuerdo con la presente invención, la unidad estructural liberadora de NO se selecciona del grupo que consiste en $-NO$, $-C(O)-(CH_2)_n-ONO_2$, $-O-(CH_2)_n-ONO_2$, $-(CH_2)_n-ONO_2$, $-C(O)-CH_2-C(CH_3)_2-SNO$, $-NH-CH_2-C(CH_3)_2-SNO$, $-CH_2-C(CH_3)_2-SNO$,

10





5

10

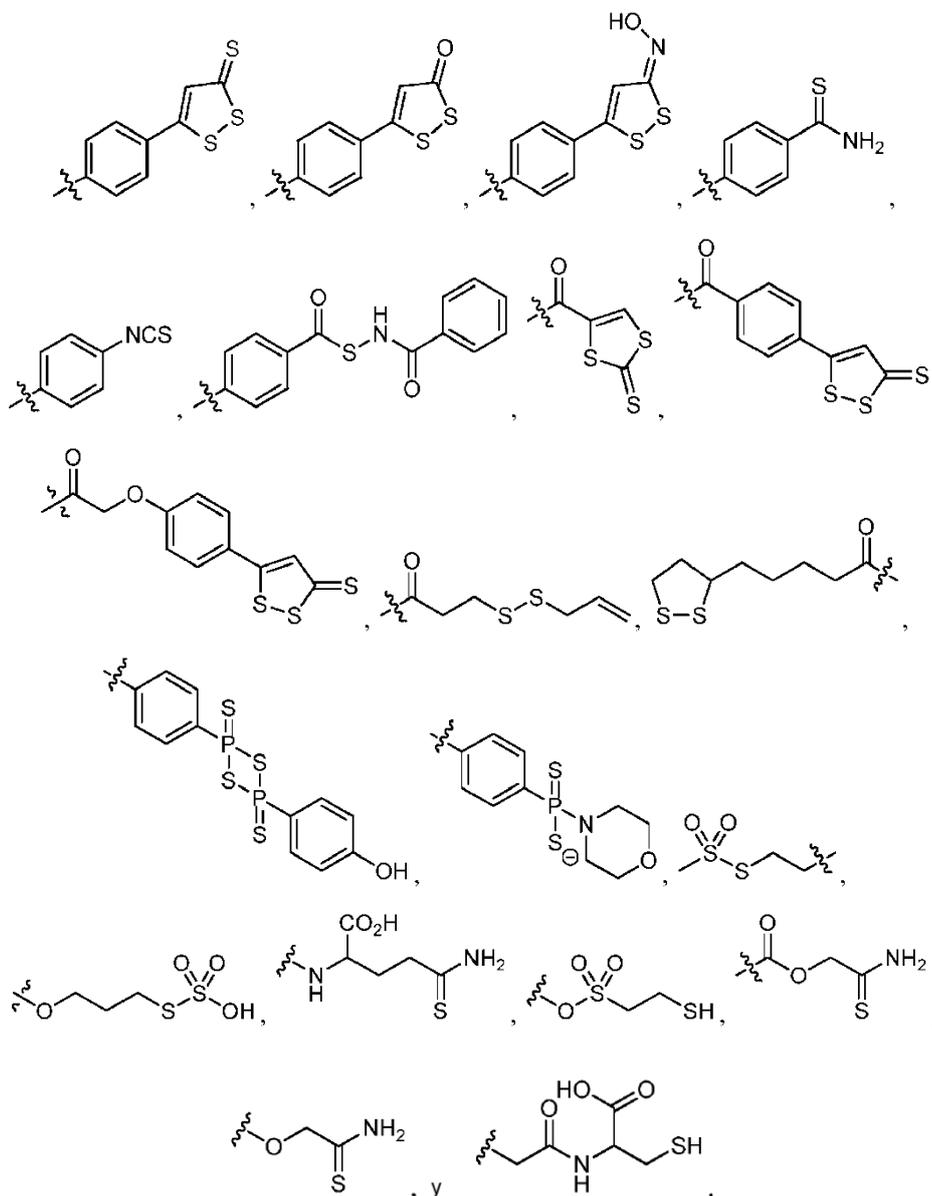
15

20

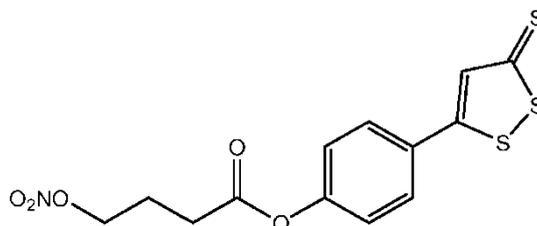
en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; R_a es H, alquilo C₁-C₁₀, arilo, S(O)₂-arilo, CN, o CON(R_b)₂; y cada uno de R_b, independientemente, es H o alquilo C₁-C₁₀.

El término "alquilo" se refiere a una unidad estructural de hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, tal como -CH₃ o -CH(CH₃)₂. El término "arilo" se refiere a una unidad estructural de hidrocarburo que tiene uno o más anillos aromáticos. Ejemplos de unidades estructurales arilo incluyen fenilo (Ph), naftilo, pirenilo, antrilo y fenantrilo. Alquilo y arilo mencionados en el presente documento incluyen tanto unidades estructurales sustituidas como no sustituidas, a menos que se especifique otra cosa. Los posibles sustituyentes en arilo incluyen, pero no se limitan a, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₂₀, cicloalqueno C₃-C₂₀, heterocicloalquilo C₁-C₂₀, heterocicloalqueno C₁-C₂₀, alcoxi C₁-C₁₀, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, alquilamino C₁-C₁₀, dialquilamino C₁-C₂₀, arilamino, diarilamino, alquilsulfonamino C₁-C₁₀, arilsulfonamino, alquilimino C₁-C₁₀, arilimino, alquilsulfonimino C₁-C₁₀, arilsulfonimio, hidroxilo, halo, tio, alquiltio C₁-C₁₀, ariltio, alquilsulfonilo C₁-C₁₀, arilsulfonilo, arilsulfonamida, heteroarilsulfonamida, acilamino, aminoacilo, aminotioacilo, amidino, guanidina, ureido, ciano, nitro, nitroso, azido, acilo, tioacilo, aciloxi, carboxilo, y éster carboxílico. Por otro lado, los posibles sustituyentes en alquilo incluyen todos los sustituyentes mencionados anteriormente excepto alquilo C₁-C₁₀.

Como se usa en el presente documento, "una unidad estructural liberadora de H₂S" se refiere a una unidad estructural que puede escindirse de un compuesto original para generar H₂S bajo condiciones fisiológicas después de que el compuesto original se administra a un paciente. De acuerdo con la presente invención, la unidad estructural liberadora de H₂S se selecciona del grupo que consiste en:



También se describe en el presente documento el compuesto NOSH, una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S sin un núcleo derivado de NSAID. La estructura de NOSH se muestra a continuación:



10

NOSH

Los compuestos de la invención pueden sintetizarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase la publicación de patente internacional No. WO 2013/025790, que discute la síntesis de los compuestos.

15

Los compuestos pueden administrarse a las plantas mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los compuestos pueden disolverse en agua y la solución puede asperjarse sobre las plantas o verterse en el suelo que cubre las raíces de las plantas. La solución también se puede agregar a un sistema de riego.

Una persona con experiencia en la técnica puede determinar fácilmente una dosificación apropiada de compuesto. La dosificación puede variar según la especie de planta, el tamaño de la planta y la salud general de la planta. Por ejemplo, la dosificación mínima por planta por día puede ser de aproximadamente 50 mg, 75 mg o 100 mg. La dosificación máxima por planta por día puede ser de aproximadamente 300 mg, 400 mg, 500 mg o 600 mg por planta por día. Una dosificación única puede disolverse en 1 o más galones de agua y administrarse a la planta.

Alternativamente, la dosificación puede disolverse en un disolvente y administrarse a la planta mediante aspersión foliar. La aspersión foliar implica alimentar la planta aplicando la composición y la dosificación directamente a las hojas de la planta. La selección del solvente y la dosificación puede ser determinada por una persona con experiencia en la técnica. El agua y el metanol son los disolventes preferidos. Deben evitarse ciertos solventes porque causan toxicidad en algunas plantas.

Se puede usar cualquier dosificación que no afecte negativamente a la planta. Las dosificaciones pueden determinarse fácilmente por ensayo y error, ya que cada tipo de planta puede tener diferentes necesidades. Por ejemplo, una dosificación mínima puede ser de aproximadamente 10 μM , 20 μM , 30 μM o 50 μM . Asimismo, por ejemplo, la dosificación máxima puede ser de aproximadamente 150 μM , 200 μM o 300 μM . Una dosificación preferida puede ser de aproximadamente 100 μM .

El daño celular en las hojas puede medirse determinando los niveles de peroxidación lipídica (contenido de malondialdehído [MDA]) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La peroxidación lipídica es un indicador de estrés ampliamente utilizado en las membranas vegetales. Por ejemplo, el método descrito por Heath y Packer es el protocolo básico utilizado o adaptado en numerosos estudios relacionados con la peroxidación lipídica. Véase Heath RL, Packer L. 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics 125,189-198. La medición de los niveles de peróxido de hidrógeno también es bien conocida en la técnica.

En otra realización, la invención se refiere a un método para cebar una planta contra factores de estrés abiótico que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H_2S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina como se describió anteriormente. Cebar la planta incluye administrar el compuesto a una planta para que pueda resistir mejor los factores de estrés abiótico tales como la sequía, la salinidad y el calor.

También se divulga un método para promover el crecimiento de la planta que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H_2S unida covalentemente a un núcleo derivado de aspirina o NOSH, como se describió anteriormente. Promover el crecimiento de las plantas puede involucrar hojas más verdes, hojas más saludables, hojas más grandes, más hojas, mayor peso general y/o un crecimiento más rápido en comparación con las plantas de control.

La planta puede ser tratada por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de la planta puede comenzar en la etapa de plántulas donde las semillas se pueden recubrir con una composición que contiene el compuesto. Las composiciones pueden formularse de tal manera que el compuesto se libere lentamente a la semilla durante todo el proceso de germinación. La planta también puede tratarse después de la germinación de la semilla mediante métodos tradicionales mediante los cuales se administran alimentos y fertilizantes vegetales, tal como por aspersión foliar o mediante la administración del compuesto directamente al suelo o durante el riego.

Ejemplos

40 Ejemplo 1.

El presente estudio muestra el efecto de mejora de la aplicación de NOSH-aspirina en plantas de *Medicago truncatula* sometidas a condiciones de estrés por sequía, por lo que el daño celular se redujo significativamente, al igual que el contenido de peróxido de hidrógeno, después de la aplicación del agente de cebado, destacando así un novedoso uso de funciones para este compuesto

45 Material vegetal y condiciones de estrés

Se utilizaron plantas maduras (40d) de *Medicago truncatula* ecotipo Jemalong A17 para los propósitos de este estudio. Estos se cultivaron en medio de suelo bajo condiciones de crecimiento óptimas y controladas y luego se sometieron a estrés por sequía. La sequía se impuso reteniendo el riego durante 9 días (para conocer las condiciones detalladas de crecimiento y estrés, véase Filippou et al., 2011). Tanto NOSH como NOSH-aspirina se aplicaron a una concentración de 100 μM mediante aspersión foliar al comienzo de la imposición de estrés. Los donantes híbridos se diluyeron en 70% (v/v) y 30% (v/v) de metanol, 20% (v/v) de acetona o 20% (v/v) de DMSO. El daño celular se evaluó mediante los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS) y el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como se describió previamente (Filippou et al., 2011; Tanou et al., 2012), mientras que la capacidad osmoprotectora se evaluó mediante el contenido de prolina (ensayo de ninhidrina) como se describió previamente (Antoniu et al., 2013). El análisis de expresión génica por RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador Biorad IQ5 como se describió previamente (Filippou et al., 2013b). La cuantificación relativa de la expresión génica y el análisis estadístico de todos los datos de qRT-PCR (prueba de asignación aleatoria de reasignación fija por pares) se

realizaron utilizando el software REST de acuerdo con Pfaffl et al. (2002) El gen actina 11 se usó como un gen de referencia de mantenimiento. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando tres conjuntos biológicos independientes de muestras como réplicas (con un mínimo de tres plantas independientes por muestra agrupada).

Resultados y discusión

5 Daño celular

Se realizó un examen de los niveles de daño celular mediante la determinación espectrofotométrica de la peroxidación lipídica. Se observó daño significativo de la membrana bajo condiciones de sequía; sin embargo, el contenido de MDA se redujo después del pretratamiento con NOSH y NOSH-aspirina (NOSH-A) diluido en 70% (v/v) de MetOH, con NOSH-aspirina proporcionando una protección estadísticamente significativa en comparación con las muestras de control (Fig. 1).

El experimento se repitió utilizando MetOH al 30% (v/v) como disolvente, donde el efecto protector del pretratamiento con NOSH-A se observó una vez más, con plantas cebadas que mostraron niveles de peroxidación lipídica significativamente más bajos en comparación con muestras de control estresadas por la sequía (Figura 2).

Se hicieron intentos adicionales para examinar la eficiencia de otros solventes para NOSH-A; estos incluyeron 20% de DMSO y 20% de acetona. Sin embargo, el tratamiento con el solvente en sí dio como resultado síntomas de toxicidad (clorosis extensa; véase Fig. 3) aunque la protección en plantas pretratadas con NOSH-A todavía era evidente por los niveles más bajos de peroxidación lipídica; por lo tanto, estos solventes fueron evitados para estudios adicionales y MetOH fue seleccionado como un solvente óptimo para el donante.

Contenido de especies oxigenadas reactivas

20 Las condiciones de estrés abiótico están asociadas con mayores niveles de especies oxigenadas reactivas (ROS), que son tóxicas para las células. Durante tales condiciones, la producción de ROS excede la capacidad de los sistemas antioxidantes para eliminarlos, causando estrés oxidativo. La cuantificación del contenido de H₂O₂ (ROS mayor) reveló una inducción masiva en plantas estresadas por la sequía, que se revirtió significativamente en plantas pretratadas con NOSH-aspirina (disuelto en 70% (v/v) de MetOH) en comparación con las muestras de control (Fig. 4)

25 De manera similar, las plantas pretratadas con NOSH-A antes de la imposición de estrés por sequía mostraron niveles de H₂O₂ significativamente más bajos en comparación con las muestras de estrés por sequía cuando se usaba 30% (v/v) de MetOH (Fig. 5).

30 Además, se evaluó el contenido de prolina ya que la prolina es una molécula osmoprotectora importante involucrada en la respuesta de defensa de las plantas a las condiciones de estrés abiótico (Filippou et al., 2013b). Los resultados mostraron que el pretratamiento de las plantas con NOSH-A (disuelto en 30% (v/v) de MetOH) antes de la imposición de estrés por sequía resultó en un mayor contenido de prolina en comparación con las muestras solas estresadas por la sequía (Fig. 6).

35 Finalmente, el análisis de expresión génica por qRT-PCR se realizó para genes clave relacionados con la defensa, incluidos los principales antioxidantes enzimáticos (CAT, Cu/ZnSOD, FeSOD, cAPX), así como genes involucrados en la biosíntesis de prolina (P5CS, P5CR). De manera interesante, las plantas pretratadas con NOSH-A demostraron una regulación transcripcional significativa para la mayoría de los genes examinados, con FeSOD, P5CS y P5CR mostrando una inducción significativa en plantas pretratadas y posteriormente estresadas en comparación con plantas solas estresadas, mientras que cAPX mostró una supresión significativa (Fig. 7). La inducción en los niveles de expresión del gen de la enzima biosintética de prolina respalda el aumento del contenido de prolina observado,

40 mientras que la inducción en las transcripciones de FeSOD está de acuerdo con un informe reciente de Fotopoulos et al. (2014), quienes demostraron que el tratamiento con 100 µM de nitroprusiato sódico donador de NO da como resultado una inducción significativa de FeSOD en plantas maduras de *Medicago truncatula*.

45 Ejemplo 2

Se ha llevado a cabo un nuevo experimento de gran enfoque farmacológico, donde se aplicaron una variedad de tratamientos y combinaciones de los mismos. Los tratamientos fueron los siguientes:

w-m	Control (metanol)
D-m	Sequía (metanol)
D-w	Sequía (H₂O)
D-N	Sequía NOSH
D-NC	Sequía -NOSH-cPTIO
D-NH	Sequía -NOSH-HXL
D-NCH	Sequía-NOSH-cPTIO-HXL
D-NA	Sequía NOSHA
D-NAC	Sequía-NOSHA-cPTIO
D-NAH	Sequía-NOSHA-HXL
D-NACH	Sequía-NOSHA-cPTIO-HXL

5 donde cPTIO representa un inhibidor de NO, mientras que HXL es un inhibidor de H₂S. Además de la configuración previa de control de muestreo y muestras estresadas por la sequía, las plantas se regaron a los 6d después de la imposición de estrés por sequía y se realizó un muestreo adicional 1d después del regado para examinar la recuperación de las plantas, mientras que se impuso una segunda ola de estrés por sequía para ver si las plantas preparadas desarrollan un efecto de "memoria" a más largo plazo.

Material vegetal y condiciones de estrés

10 Se utilizaron plantas maduras (42 d) de *Medicago sativa* para los propósitos de este estudio. Estas se cultivaron en medio de suelo bajo condiciones de crecimiento óptimas y controladas y luego se sometieron a estrés por sequía. La sequía se impuso reteniendo el riego hasta que se observaron síntomas de sequía (pérdida de turgencia, marchitez, clorosis) (6 días después de la imposición de estrés). Las muestras se rehidrataron para observar el potencial de recuperación después de 1 día (7 d). Tanto NOSH como NOSH-aspirina se aplicaron a una concentración de 100 µM mediante aspersión foliar al comienzo de la imposición de estrés. Los donantes híbridos se diluyeron en metanol al 30% (v/v). Los parámetros fisiológicos (conductancia estomática y fluorescencia de clorofila) se midieron con un DT-Porometer AP4 (Delta-TDevices, Cambridge, Reino Unido) y un fluorómetro de clorofila OptiSci OS-30p (Opti-Sciences, Hudson, NH, EE. UU.) Respectivamente (Filippou et al., 2013). La fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) de las hojas representa la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (PSII). El daño celular se evaluó mediante los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS), contenido de óxido nítrico (NO) (estrés nitrosativo) y contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (estrés oxidativo) como se describió previamente (Filippou et al., 2011; Tanou et al., 2012), mientras que la capacidad osmoprotectora se evaluó mediante el contenido de prolina (ensayo de ninhidrina) como se describió anteriormente (Antoniou et al., 2013). Las actividades enzimáticas antioxidantes (SOD y CAT) se midieron como se describió anteriormente (Filippou et al., 2014). El análisis de expresión génica por RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador Biorad IQ5 como se describió anteriormente (Filippou et al., 2013). La cuantificación relativa de la expresión génica y el análisis estadístico de todos los datos de qRT-PCR (prueba de asignación aleatoria de reasignación fija por pares) se realizaron utilizando el software REST según Pfaffl et al. (2002) El gen actina 11 se usó como un gen de referencia de mantenimiento. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando tres conjuntos biológicos independientes de muestras como réplicas (con un mínimo de quince plantas independientes por muestra agrupada). La configuración experimental se muestra esquemáticamente en la figura 8.

Resultados y discusión

Fenotipos

5 La observación macroscópica (fenotípica) de las plantas mostró que las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A que posteriormente fueron estresadas por la sequía habían mejorado significativamente la vitalidad, la turgencia y el enverdecimiento en comparación con las plantas estresadas por la sequía que demostraron clorosis extensa y pérdida de turgencia indicativa de daño relacionado con el estrés relacionado a los 6 d después de la imposición de estrés (Fig. 9).

10 La rehidratación durante 1 día reveló que las muestras pretratadas con NOSH y NOSH-A habían mejorado notablemente la capacidad de recuperación en comparación con las muestras solas estresadas por la sequía, ya que las plantas pretratadas retuvieron la turgencia y el enverdecimiento, mientras que las plantas solas estresadas mostraron clorosis extensa y signos iniciales de necrosis (Fig. 10)

15 De manera interesante, se dejó que las plantas crecieran después de volver a regar durante otros 6 días sin riego adicional sobre la base de una segunda "ola" de estrés por sequía. Las observaciones fenotípicas revelaron que las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A mantuvieron el crecimiento y la vitalidad, mientras que las plantas solas estresadas por la sequía mostraron niveles extensos de necrosis tisular (Fig. 11).

Mediciones fisiológicas

20 Las mediciones de parámetros fisiológicos indicativos del estado fisiológico de la planta indicaron que las plantas estresadas por la sequía tenían niveles significativamente más bajos (conductancia estomática y fluorescencia de clorofila) en comparación con las plantas regadas indicativas de un estado estresado, mientras que las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A y posteriormente estresadas, había mejorado (de manera significativa más alta) la conductancia estomática y los niveles de clorofila en comparación con las muestras estresadas por la sequía (Fig. 12).

Daño celular

25 Se realizó un examen de los niveles de daño celular mediante la determinación espectrofotométrica de la peroxidación lipídica. Se observó daño significativo de la membrana bajo condiciones de sequía; sin embargo, el contenido de MDA se redujo después del pretratamiento con NOSH y NOSH-aspirina, con NOSH y NOSH-aspirina proporcionando una protección estadísticamente significativa en comparación con las muestras estresadas por la sequía (Fig. 13). Además, la rehidratación no pudo mejorar el daño celular en muestras estresadas por la sequía (mostrando un aumento adicional en el contenido de MDA a los 7 d), mientras que las muestras pretratadas con NOSH y NOSH-A mantuvieron niveles bajos de contenido de MDA cerca de los de las muestras de control, regadas (Fig. 13)

30 Contenido de especies oxigenadas y nitrogenadas reactivas

35 Las condiciones de estrés abiótico están asociadas con mayores niveles de contenido de especies oxigenadas reactivas (ROS) y nitrogenadas reactivas (RNS), los cuales son tóxicos para las células. Durante tales condiciones, la producción de ROS y RNS excede la capacidad de los sistemas de defensa antioxidantes para eliminarlos, causando estrés nitro-oxidativo. La cuantificación del contenido de H₂O₂ (ROS mayor) y óxido nítrico (NO; RNS mayor) reveló una inducción masiva en plantas estresadas por la sequía, que se revirtió significativamente en plantas pretratadas con NOSH y NOSH-aspirina en comparación con muestras estresadas por la sequía (Fig. 14A, SI). De manera interesante, el contenido de H₂O₂ se mejoró aún más en las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A después de la rehidratación a los 7 días en comparación con las respectivas muestras pretratadas y estresadas por la sequía a los 6 días (Fig. 14A), lo que indica una capacidad mejorada de recuperación que también se correlaciona con el aumento de la actividad enzimática CAT después del rehidratado en estas muestras en comparación con muestras solas estresadas por sequía (Fig. 16B).

Contenido de prolina

45 Además, se evaluó el contenido de prolina ya que la prolina es una molécula osmoprotectora importante involucrada en la respuesta de defensa de las plantas a las condiciones de estrés abiótico (Filippou et al., 2013). Los resultados mostraron que la imposición de estrés por sequía conduce a una inducción masiva de prolina como se esperaba (Filippou et al, 2014), mientras que el pretratamiento de plantas con NOSH y NOSH-A antes de la imposición de estrés por sequía dio como resultado un contenido de prolina significativamente menor en comparación con muestras solas estresadas por sequía (Fig. . 15).

Enzimas antioxidantes

50 Se evaluó la actividad enzimática de dos antioxidantes clave (SOD y CAT). SOD dismuta los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno, mientras que CAT depura directamente el peróxido de hidrógeno. Ambas enzimas parecen estar reguladas en respuesta al estrés y al pretratamiento del agente de cebado de manera diferencial (Fig. 16). Más específicamente, la actividad tanto de SOD como de CAT es inducida significativamente en las plantas estresadas por la sequía de 6 días en comparación con las plantas de control y regadas, probablemente en un intento de abordar el

estallido oxidativo resultante de la imposición de estrés, mientras que las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A y posteriormente estresadas muestran niveles de actividad SOD y CAT similares a las plantas regadas de control. De manera interesante, la rehidratación da como resultado una inversión de las tendencias, donde la actividad de SOD y CAT se induce significativamente en plantas preparadas y estresadas en comparación con plantas estresadas, lo que sugiere una capacidad mejorada de recuperación que también se correlaciona con niveles más bajos de H₂O₂ (Fig. 14). En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que la batería antioxidante enzimática celular vinculada con la depuración de ROS es muy compleja e involucra varios otros componentes (por ejemplo, APX), isoformas en varios compartimentos (por ejemplo, peroxisomas, cloroplastos, mitocondrias), así como antioxidantes no enzimáticos. (por ejemplo, ácido ascórbico, tocoferoles y glutatión).

10 Análisis de expresión génica

Finalmente, se realizó el análisis de expresión génica por qRT-PCR (Fig. 17) para genes clave relacionados con la defensa, incluidos los principales antioxidantes enzimáticos (GST17, Cu/ZnSOD, FeSOD, cAPX) vinculados con la depuración de ROS, así como los genes involucrados en biosíntesis de NO (NR). Además, también se examinó una aquaporina (PIP) que está relacionada con la respuesta al déficit hídrico y al transporte. De manera interesante, las plantas pretratadas con NOSH y NOSH-A y posteriormente estresadas en comparación con plantas solas estresadas demostraron una regulación transcripcional significativa (inducción) para las isoformas de SOD (Fig. 17) que están relacionadas con la dismutación de radicales superóxido a H₂O₂, de acuerdo con un informe reciente de Fotopoulos et al. (2014), quienes demostraron que el tratamiento con 100 μM de nitroprusiato de sodio donador de NO da como resultado una inducción significativa de FeSOD en plantas maduras de *Medicago truncatula*. Además, debe tenerse en cuenta que la rehidratación di como resultado la supresión general de la mayoría de los genes examinados en plantas pretratadas con NOSH/NOSH-A y posteriormente estresadas en comparación con plantas solas estresadas por la sequía, lo que sugiere que las plantas están en una mejor posición para recuperarse sin activación transcripcional adicional de genes relacionados con la defensa lo que consume energía para la planta.

Conclusiones

25 Los hallazgos actuales muestran la capacidad de NOSH y NOSH-aspirina para proporcionar una protección significativa en las plantas de *Medicago sativa* contra las condiciones de estrés por sequía, lo que resulta en un daño celular importante y estrés nitro-oxidativo en las plantas de control.

Ejemplo 3.

30 Se realizó un experimento in vitro para evaluar el potencial de NOSH y NOSH-A para la promoción del crecimiento en términos de aumento del área foliar en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Configuración experimental

35 Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 para los propósitos de este estudio. Las semillas se colocaron en placas de agar MS que contenían NOSH o NOSH-A 10 μM o 100 μM (diluido en acetona al 20% (v/v)) que luego se incubaron en la oscuridad a 4°C durante 4 días para fines de estratificación. También se prepararon placas de control apropiadas. Luego se colocaron las placas en una cámara de crecimiento y se tomaron muestras de las hojas a 23 DAS (días después de la siembra). Se examinaron series completas de hojas de siete plantas individuales por tratamiento (n = 7). Una serie completa de hojas consta de todas las hojas de cada planta individual, comenzando desde los cotiledones e incluyendo todas las hojas verdaderas, cosechadas y examinadas en orden de presencia en la planta (desde la hoja verdadera más vieja hasta la más joven). Estas hojas se cortan y se colocan en placas de agar donde se toman fotografías y se calculan las áreas de las hojas utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Resultados y discusión

Las Figuras 18-21 son las placas de todas las series de hojas examinadas. Los controles de acetona se usan para examinar el efecto del solvente orgánico en sí en el crecimiento de las plantas.

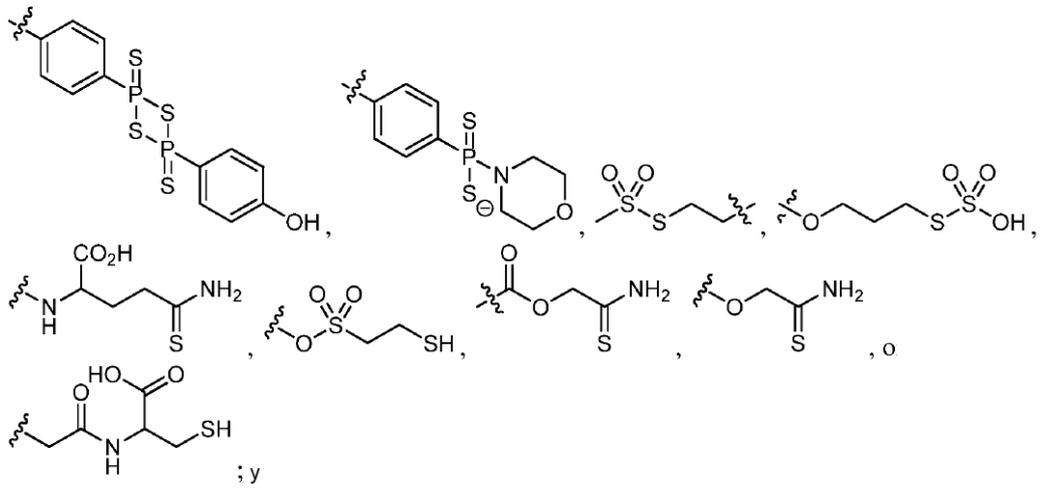
45 Una observación interesante es que las plantas tratadas con NOSH específicas mostraron un mayor enverdecimiento, lo que sugiere niveles más altos de pigmentos fotosintéticos.

El análisis del área foliar ImagenJ se realizó para plantas de control y plantas tratadas con NOSH o NOSH-A 10 μM ya que el análisis macroscópico reveló una inducción de crecimiento visible en este caso, a diferencia de las plantas tratadas con NOSH o NOSH-A 100 μM. Véase Figura 22.

50 Los resultados muestran que existe un área significativamente mayor de hoja 4 y 5 verdadera en las plantas tratadas con NOSH 10 μM en comparación con las muestras de control, mientras que no se observó un aumento significativo en las plantas tratadas con NOSH-A. De manera interesante, el área total de la roseta (área total de la hoja por planta) aumenta significativamente en un 37% en las plantas tratadas con NOSH en comparación con las plantas de control.

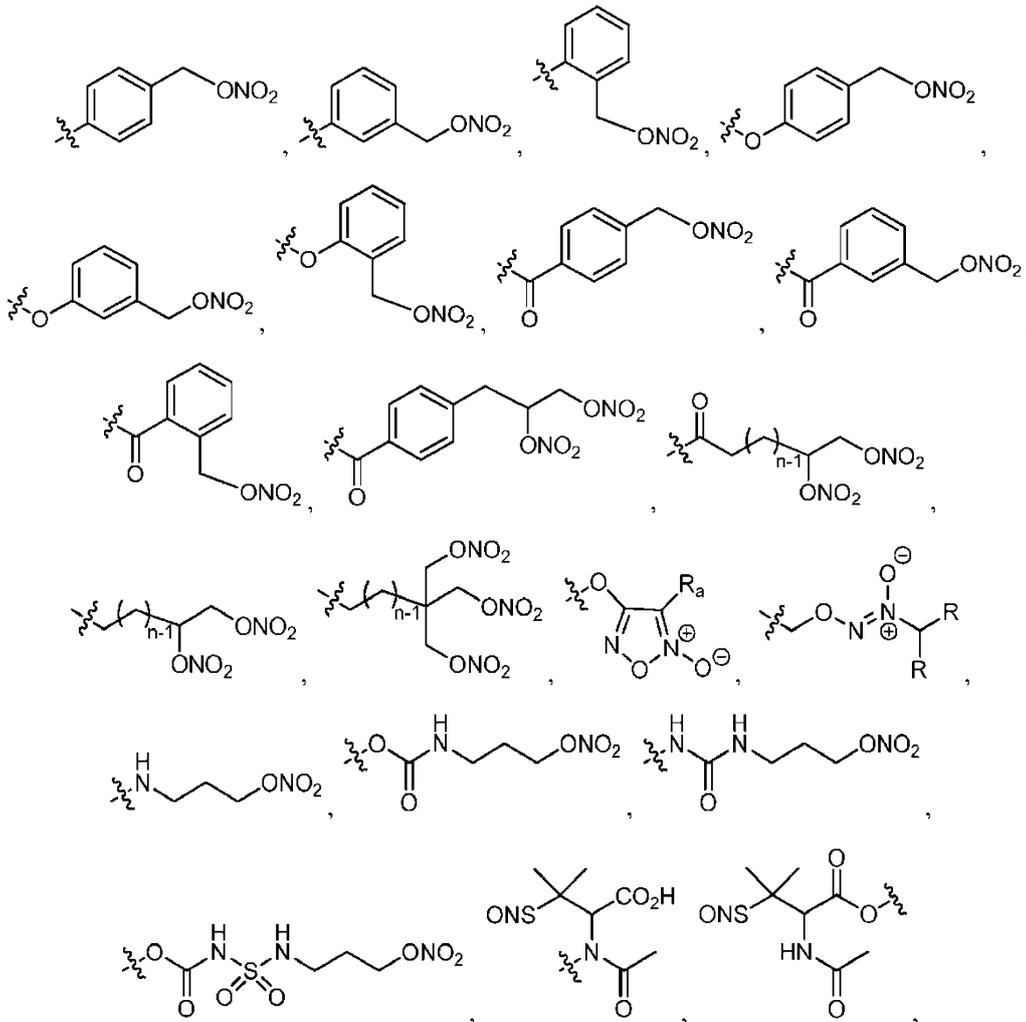
Conclusiones

Los hallazgos actuales sugieren que la aplicación de 10 μM de NOSH da como resultado una inducción significativa en el crecimiento en términos de área foliar en plantas cultivadas in vitro.

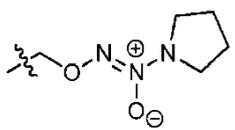


la unidad estructural liberadora de NO es $-\text{NO}$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$,

5

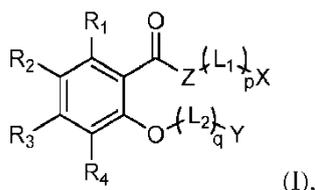


10 o



en la cual n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; R_a es H, alquilo C₁-C₁₀, arilo, S(O)₂-arilo, CN, o CON(R_b)₂; y cada uno de R_b, independientemente, es H o alquilo C₁-C₁₀.

- 5 2. Un método para preparar una planta contra factores de estrés abiótico, en el que el factor de estrés abiótico es sequía, salinidad, calor o combinaciones de los mismos, que comprende tratar la planta con una composición que comprende un compuesto que contiene una unidad estructural liberadora de NO y una unidad estructural liberadora de H₂S unida covalentemente a un núcleo de fórmula I derivado de aspirina:



en la que:

- 10 cada uno de p y q, independientemente, es 0 o 1;

cada uno de L₁ y L₂, independientemente, es un enlazador, siendo el enlazador -C(O)-, -(CH₂)_m-, -(CH₂)_m-O-, -(CH₂)_m-C(O)-, -(CH₂)_m-C(O)O-, -(CH₂)_m-OC(O)O-, -C(O)-(CH₂)_m-O-, -C(O)-(CH₂)_m-C(O)-, -OC(O)-(CH₂)_m-O-, -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)-, o -OC(O)-(CH₂)_m-C(O)O-, en el que m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7;

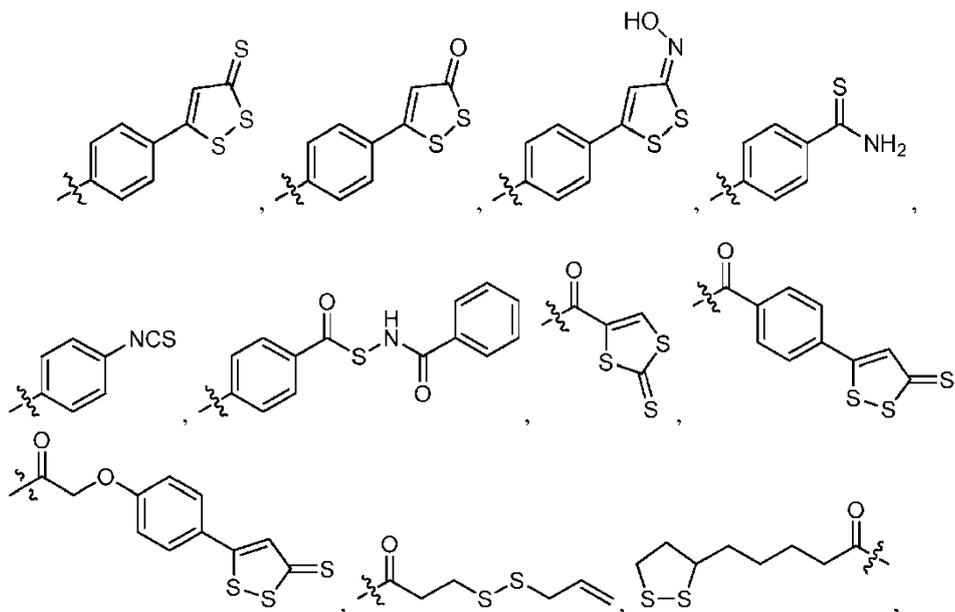
X es una unidad estructural liberadora de H₂S o una unidad estructural liberadora de NO;

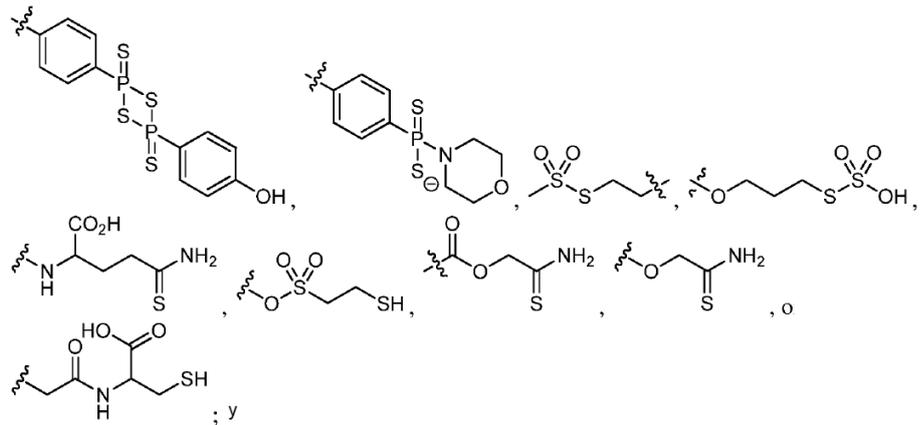
- 15 Y es una unidad estructural liberadora de NO o una unidad estructural liberadora de H₂S, siempre que X y Y no sean simultáneamente unidades estructurales liberadoras de H₂S o unidades estructurales liberadoras de NO;

Z es O o NH; y

cada uno de R₁, R₂, R₃, y R₄, independientemente, es H, halo, alquilo C₁-C₁₀, o N(R)₂, en el que R es H o alquilo C₁-C₁₀;

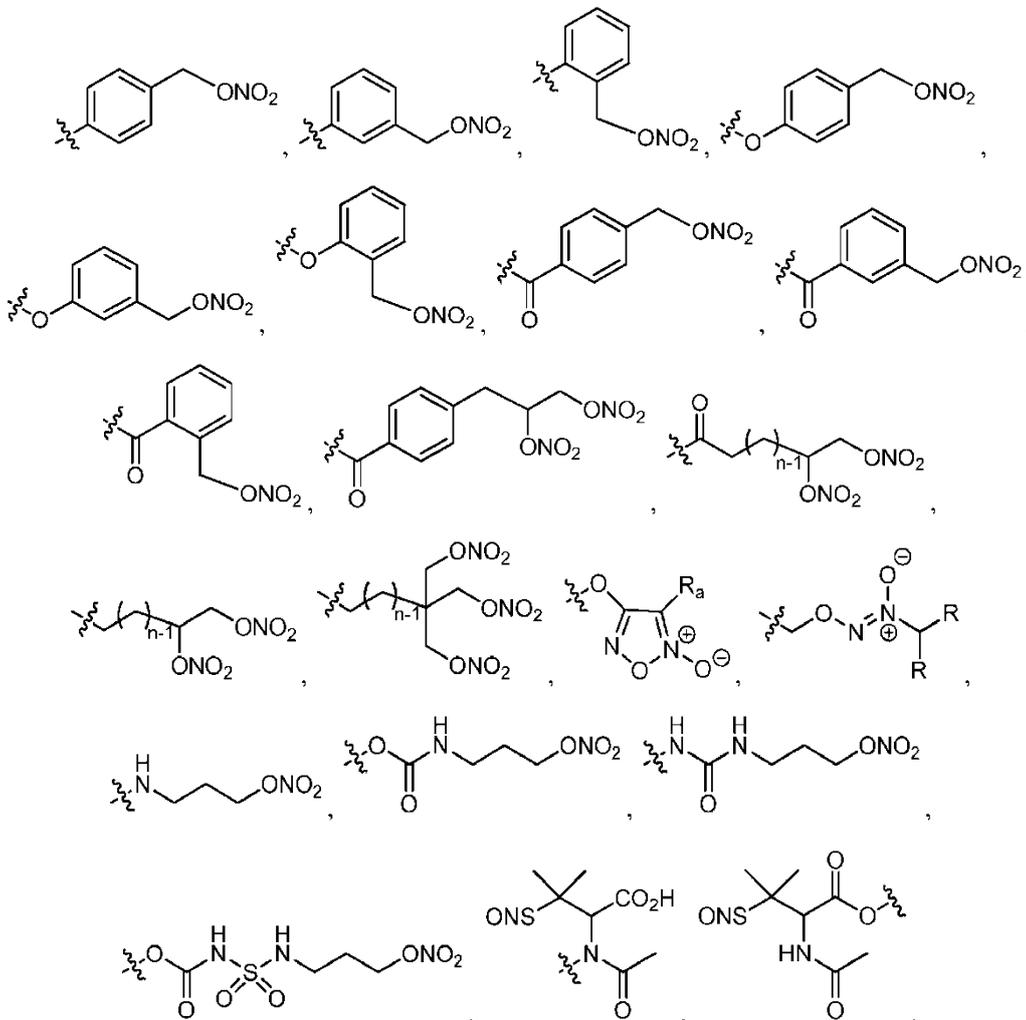
- 20 en la que la unidad estructural liberadora de H₂S es



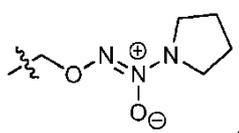


la unidad estructural liberadora de NO es $-\text{NO}$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{ONO}_2$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{SNO}$,

5

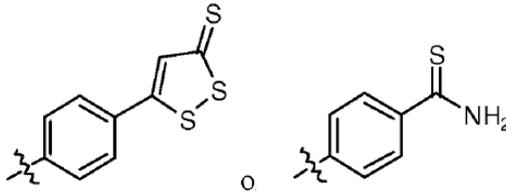


10 o



en la cual n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; R_a es H, alquilo C₁-C₁₀, arilo, S(O)₂-arilo, CN, o CON(R_b)₂; y cada uno de R_b, independientemente, es H o alquilo C₁-C₁₀.

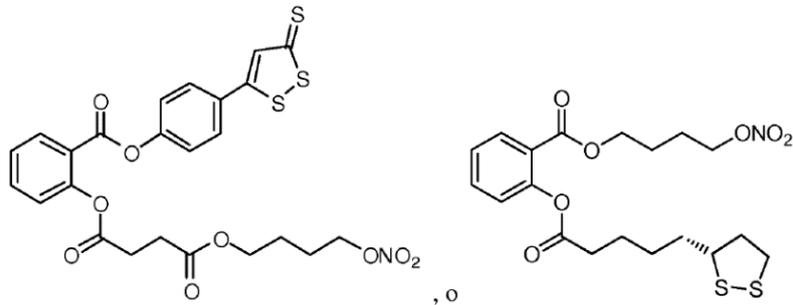
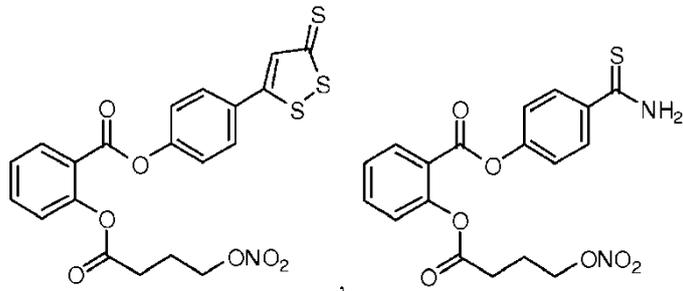
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que X es

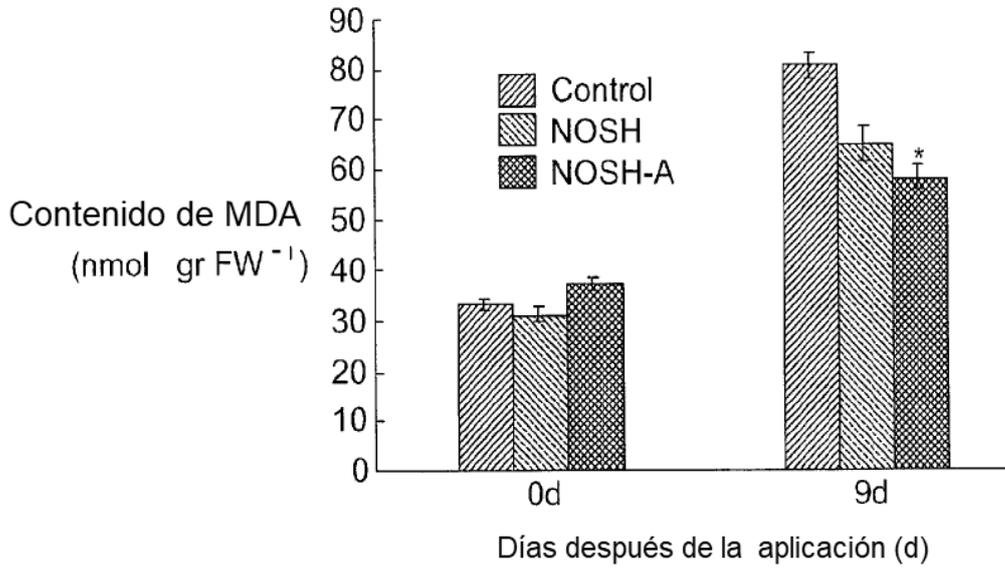


5

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que Y es -C(O)-(CH₂)_n-ONO₂.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto es





MDA (Peroxidación de lípidos)	Control	NOSH	NOSH-A
Veces de incremento en muestras estresadas por sequía	2.45	2.09	1.56

FIG. 1

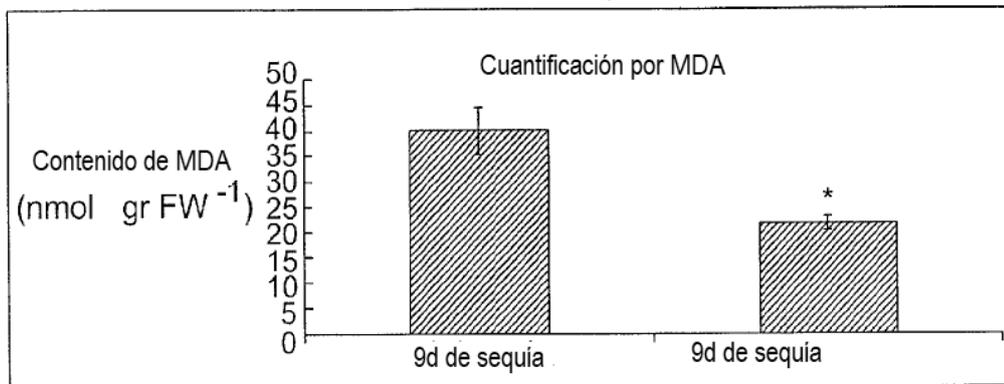


FIG. 2



FIG. 3A

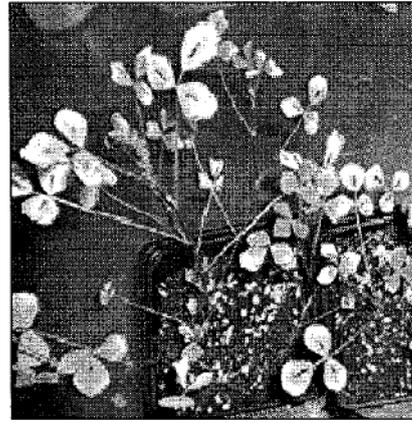
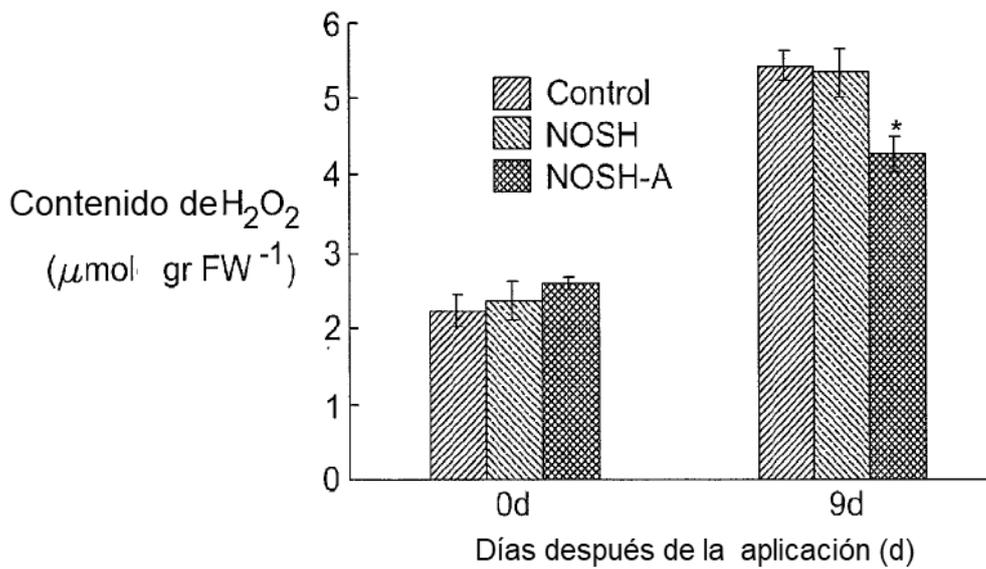


FIG. 3B



H ₂ O ₂	Control	NOSH	NOSH-A
Veces de incremento en muestras estresadas por sequia	2.42	2.26	1.65

FIG. 4

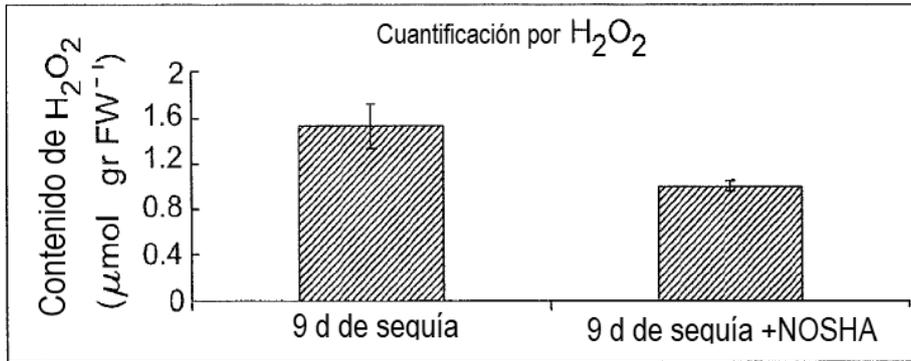


FIG. 5

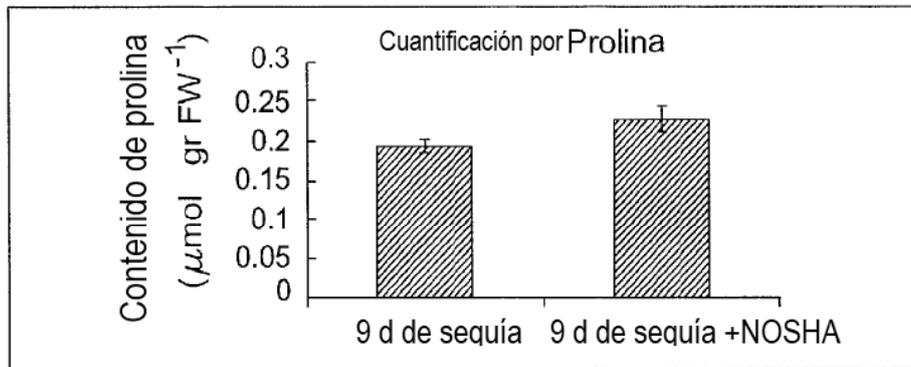


FIG. 6

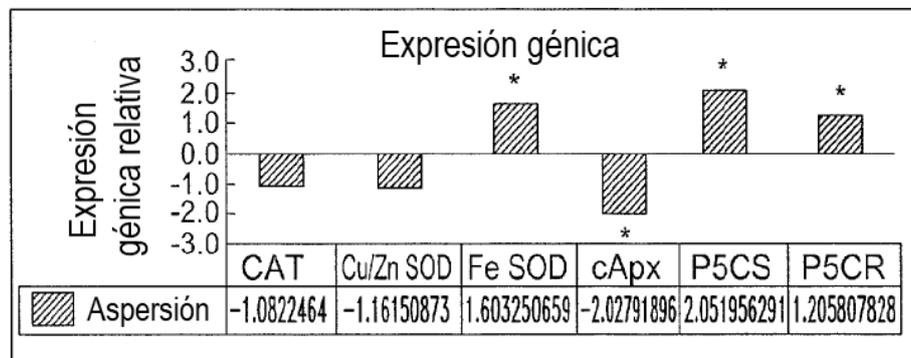


FIG. 7

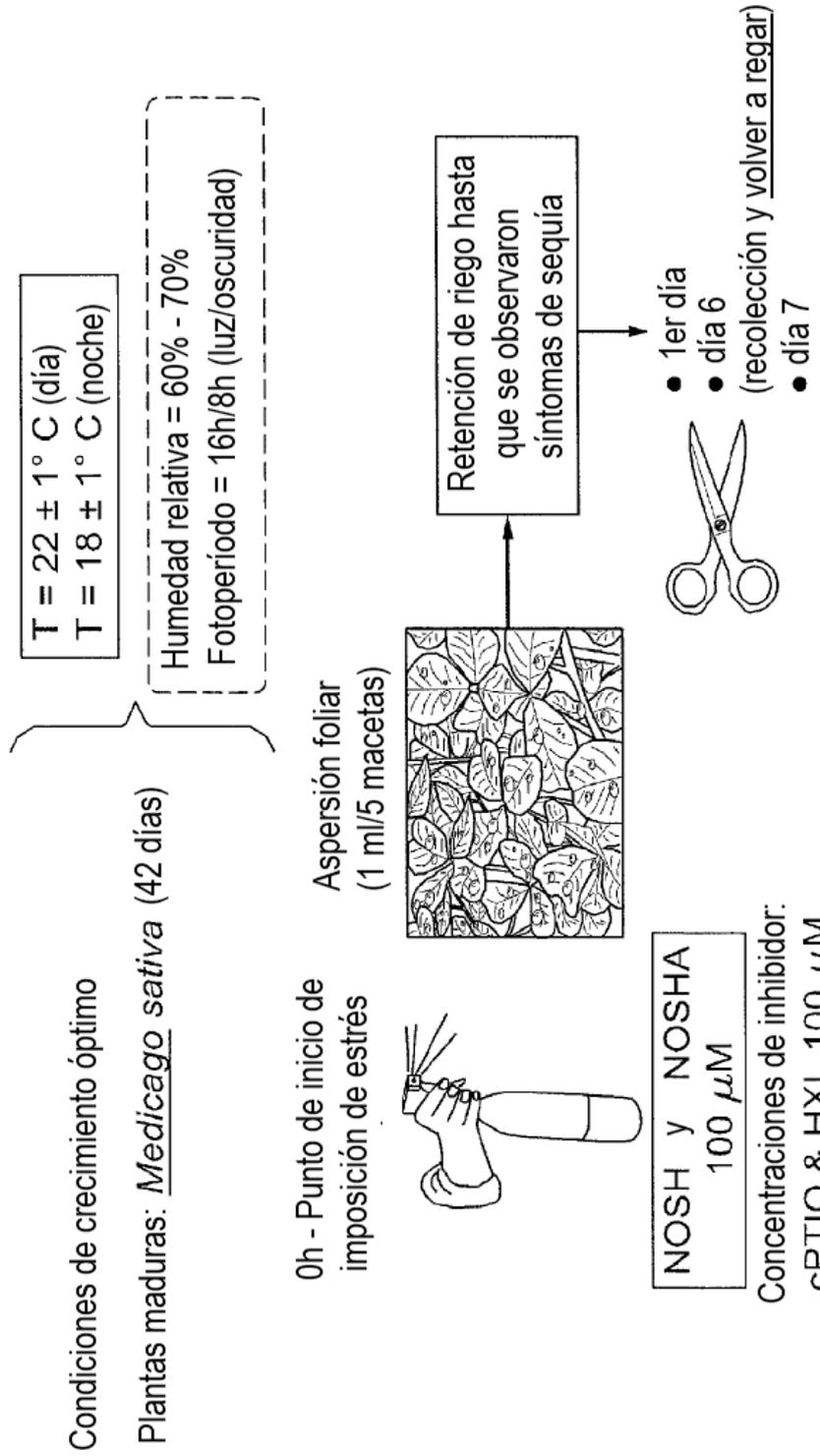


FIG. 8

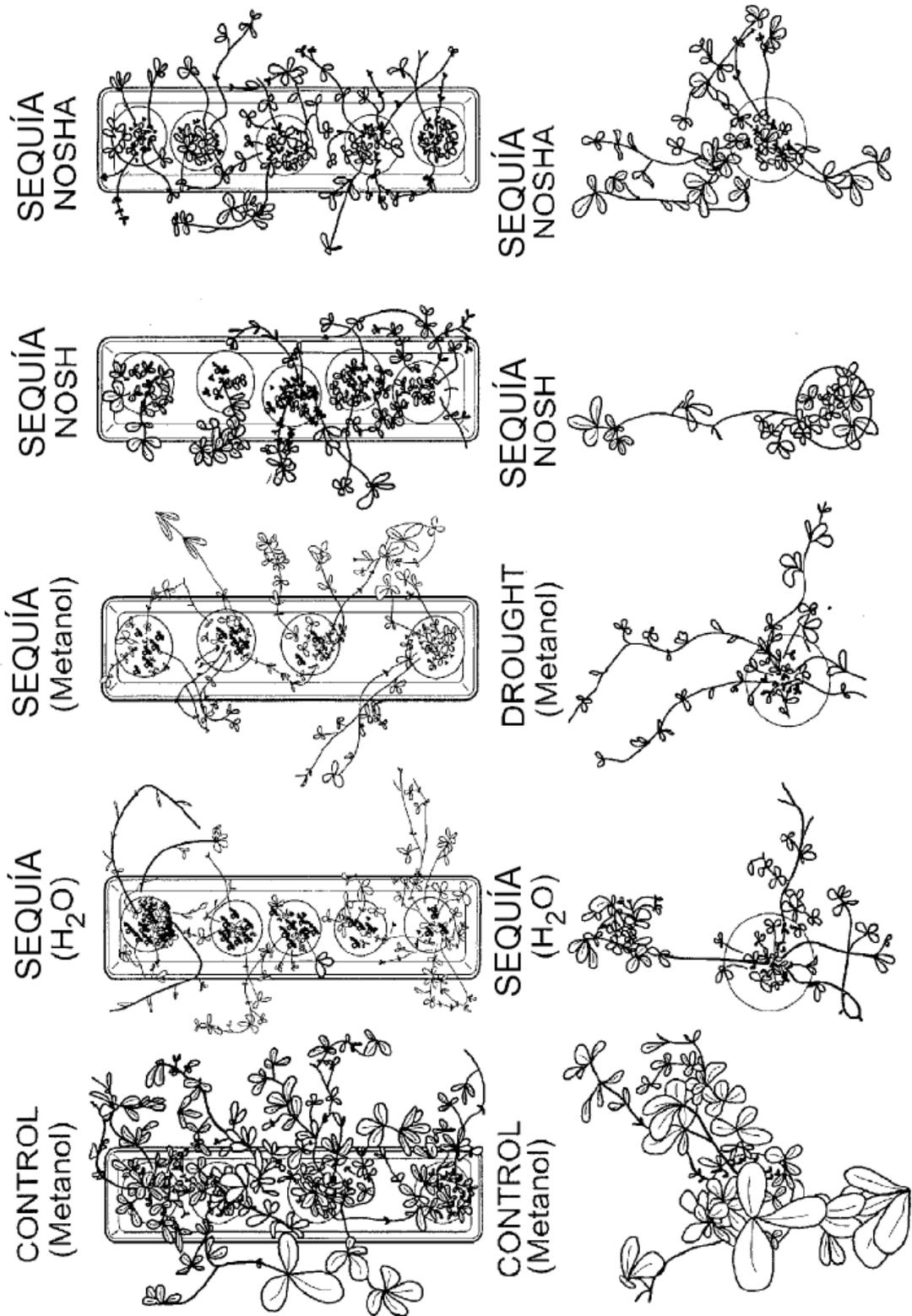


FIG. 9

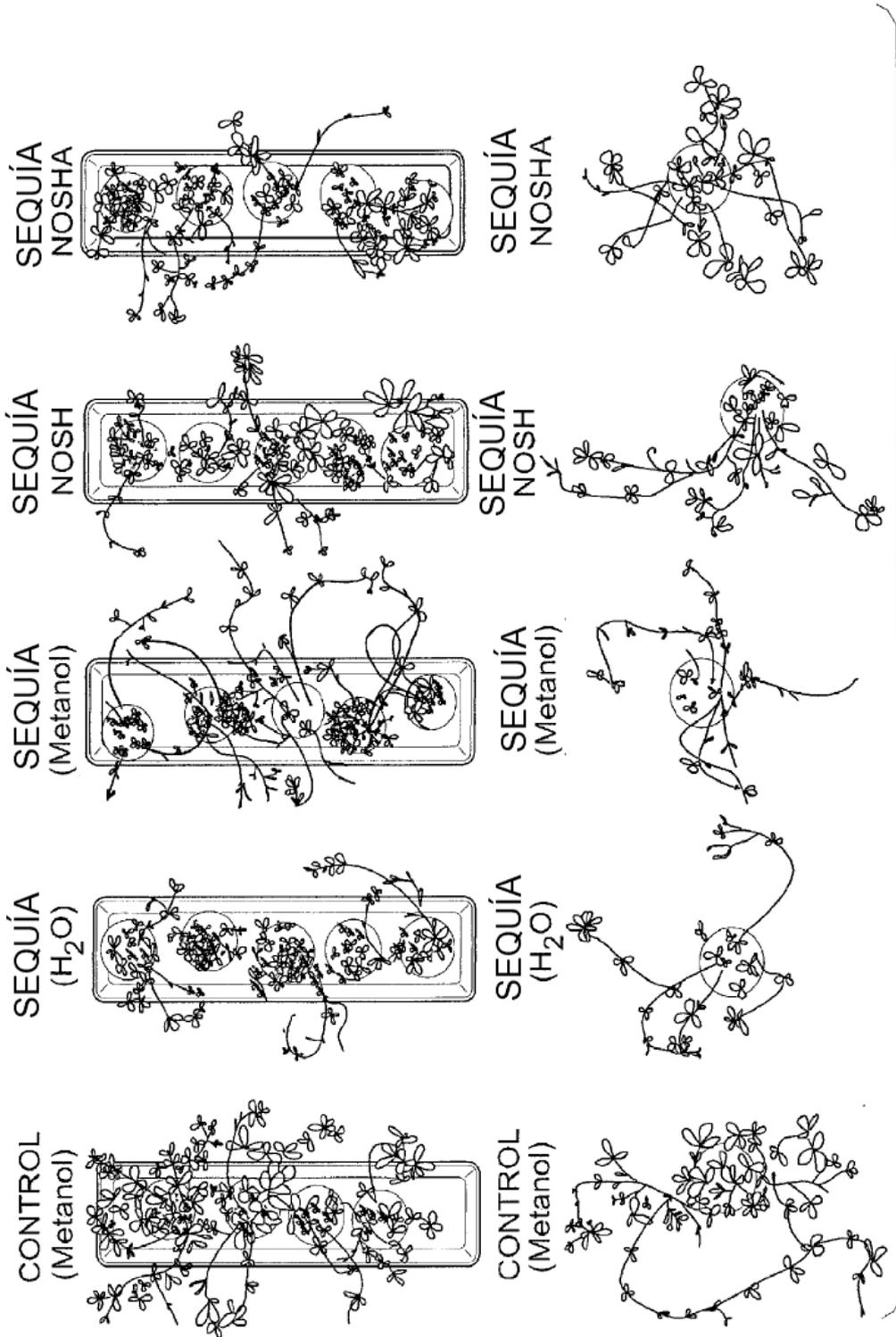


FIG. 10

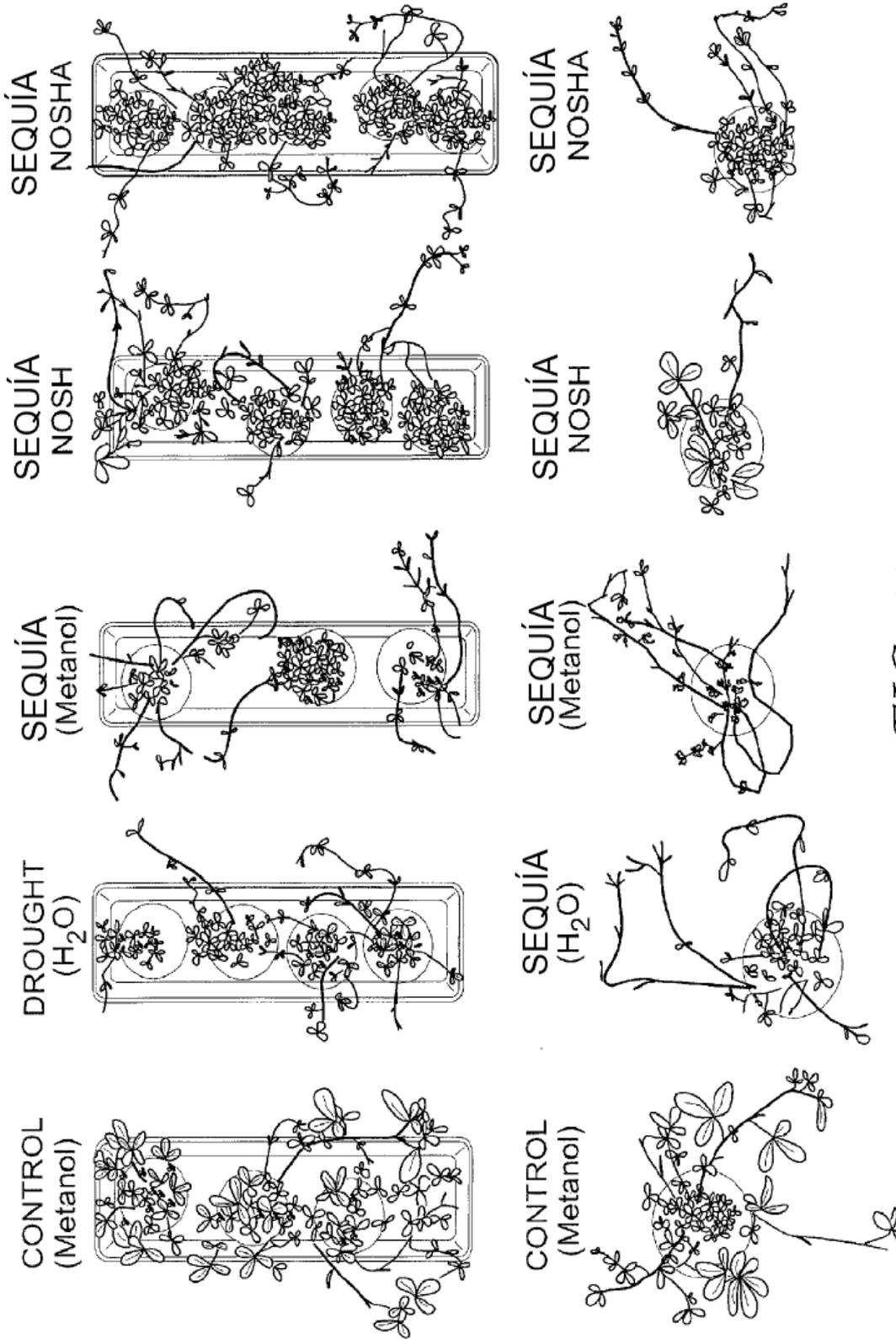


FIG. 11

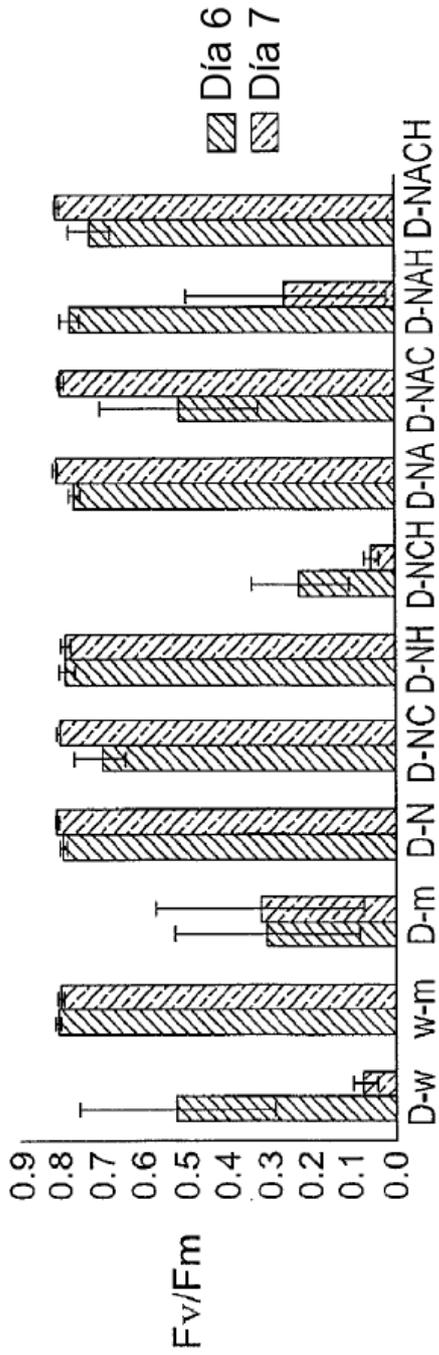


FIG. 12A

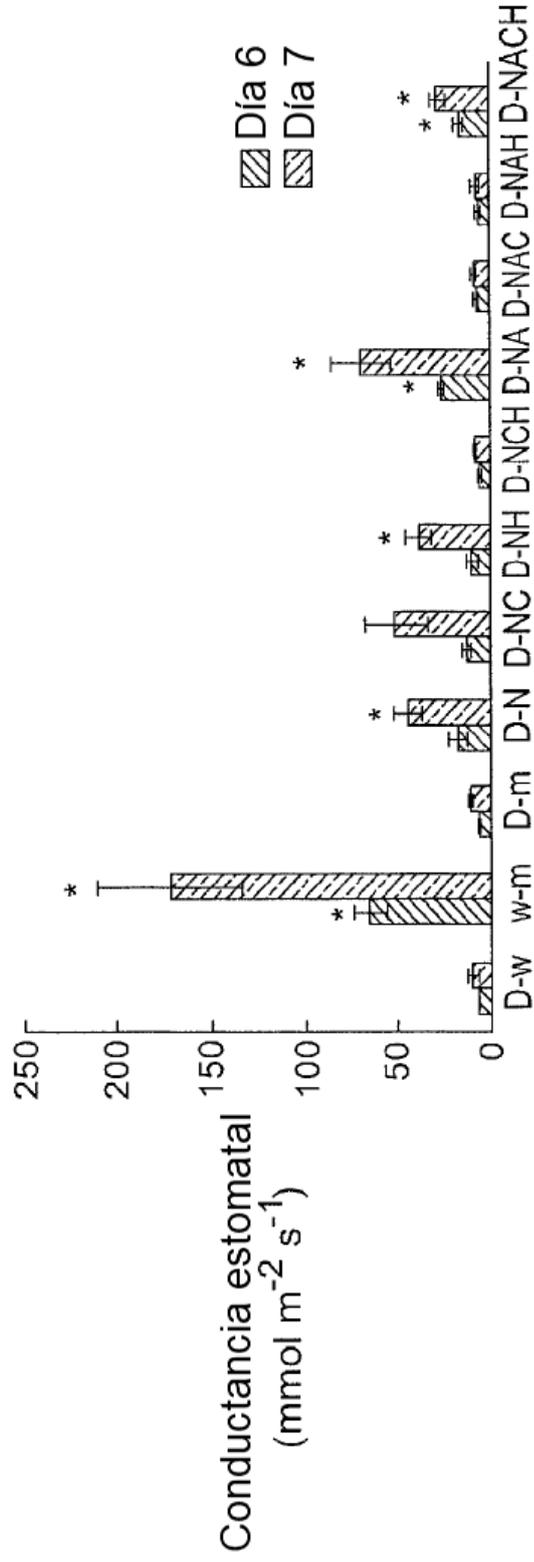


FIG. 12B

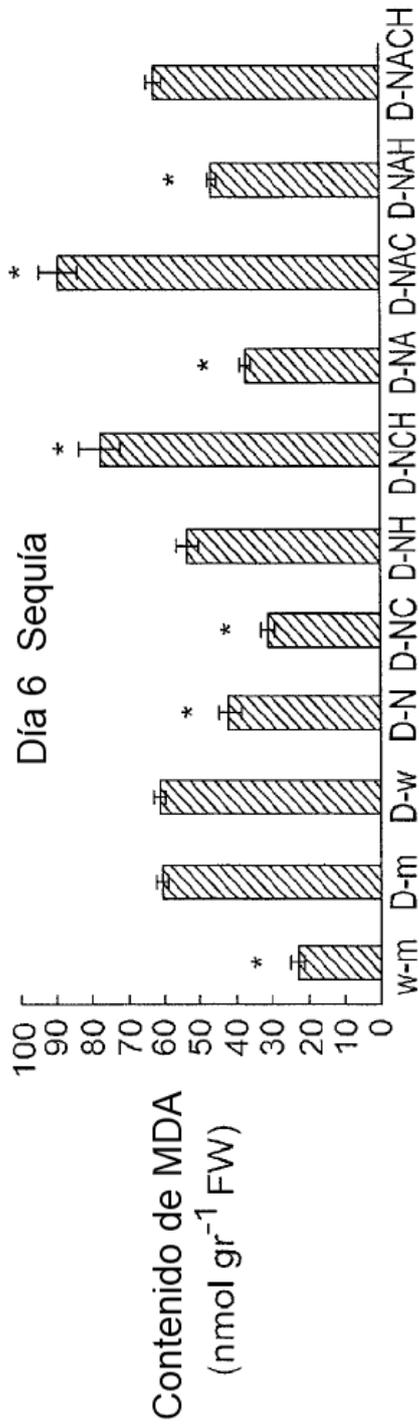


FIG. 13A

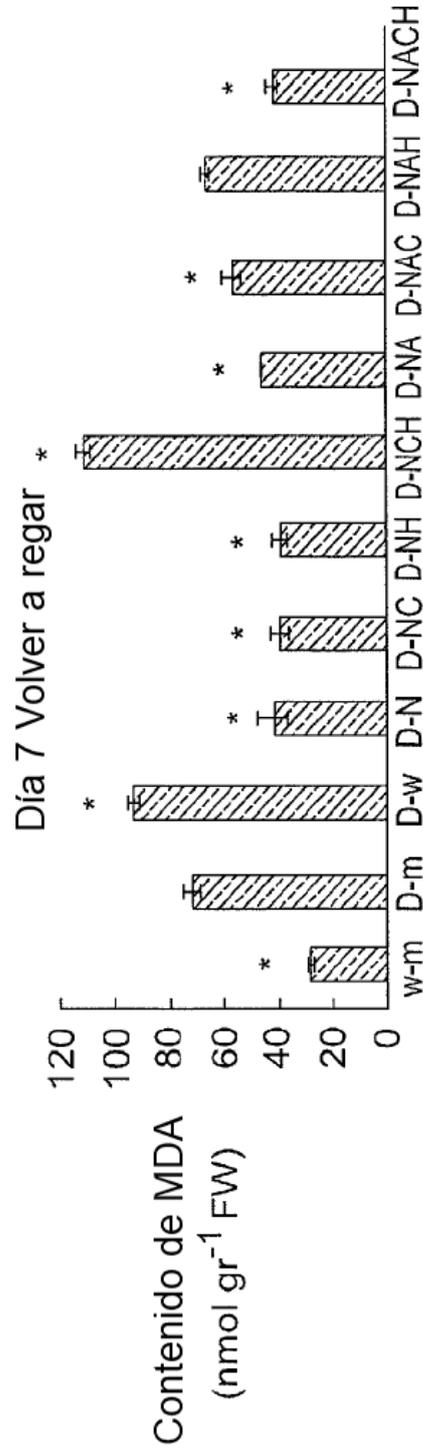


FIG. 13B

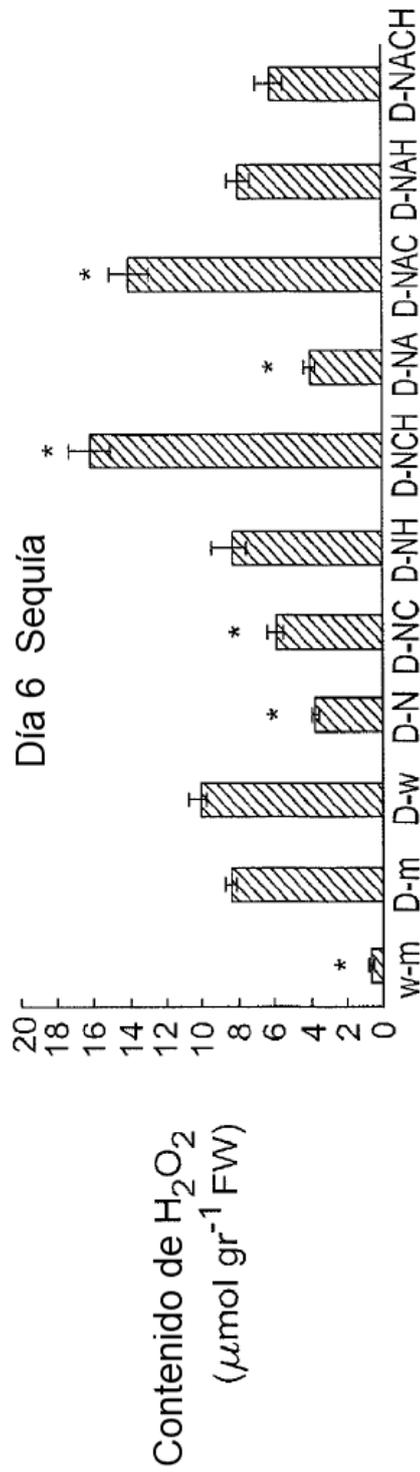


FIG. 14A-1

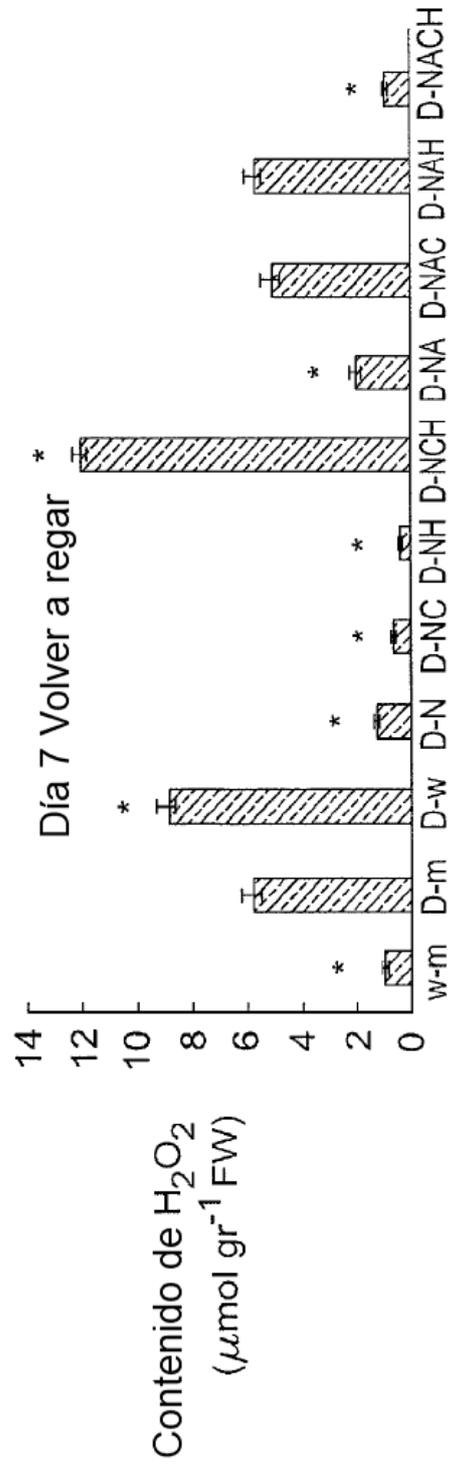


FIG. 14A-2

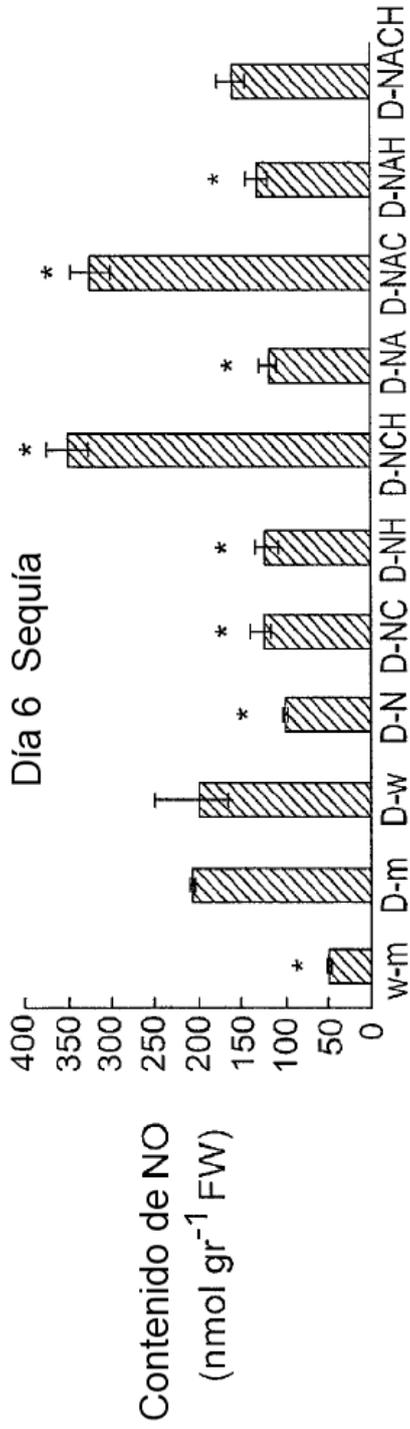


FIG. 14B-1

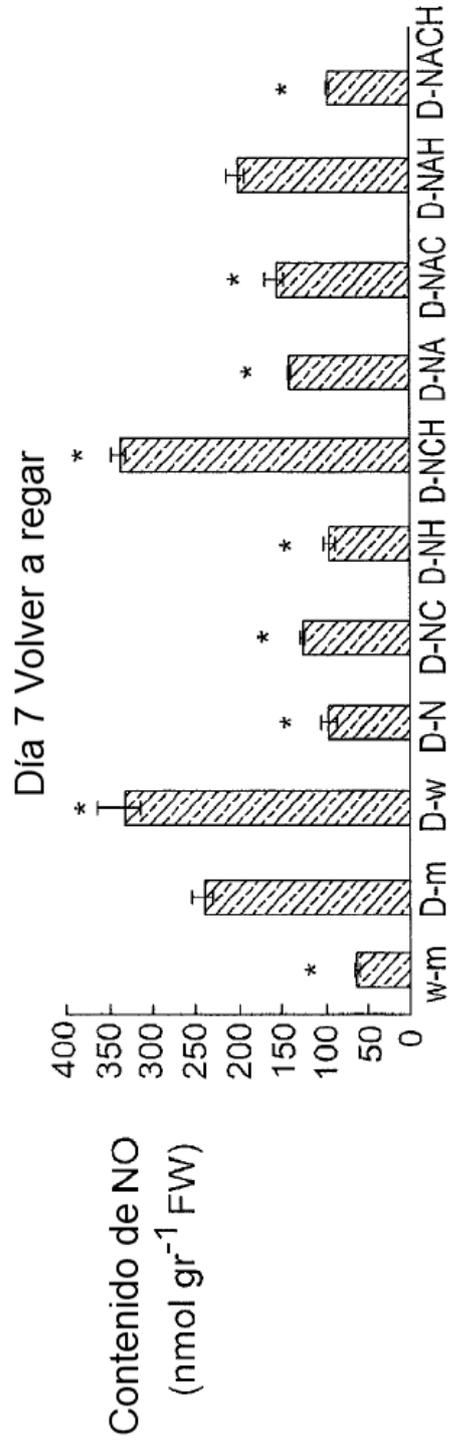


FIG. 14B-2

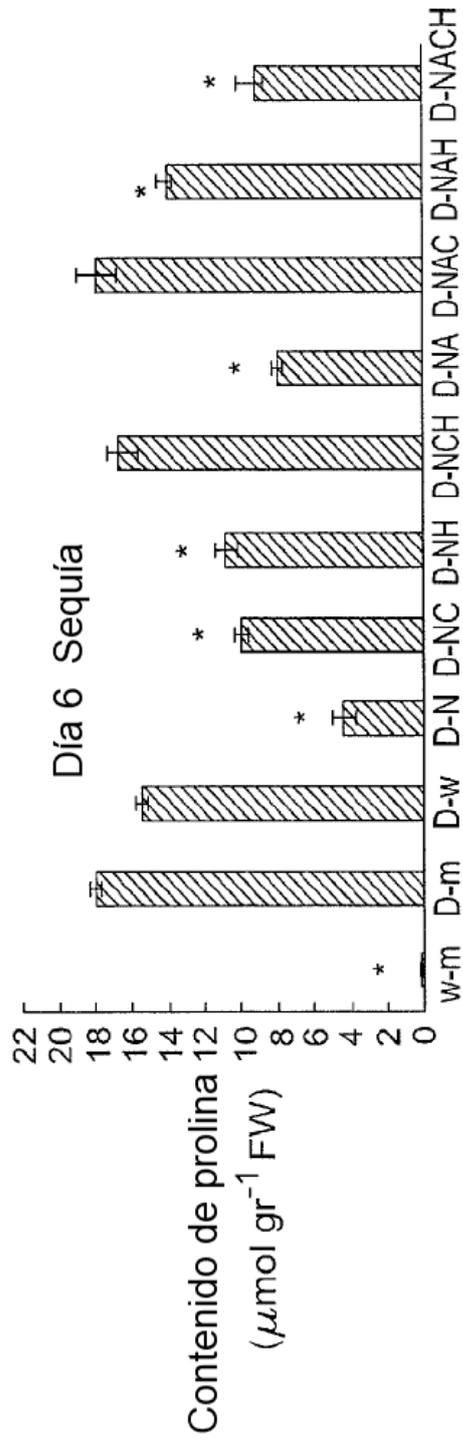


FIG. 15A

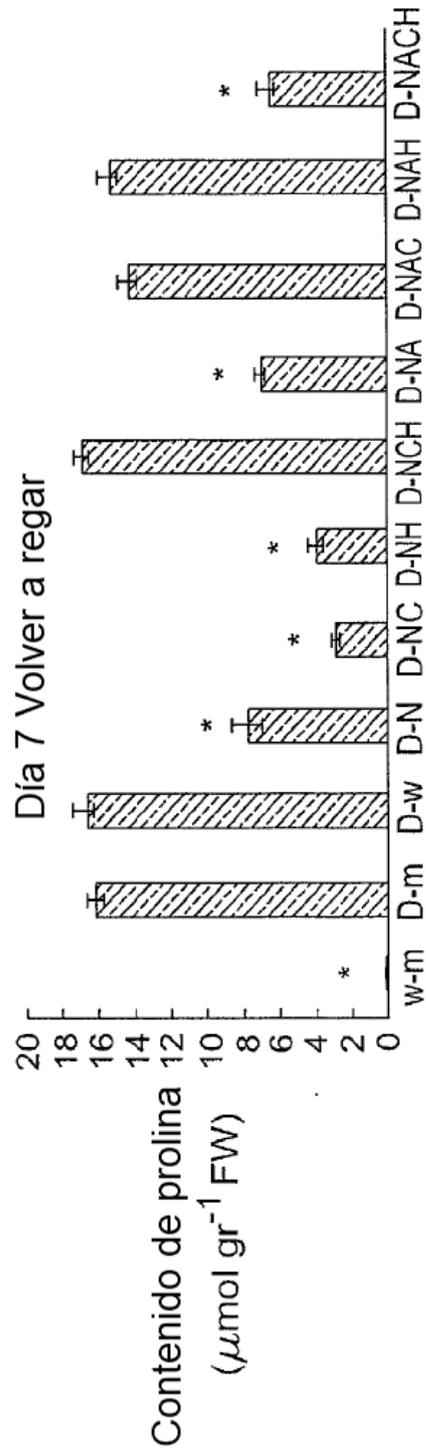


FIG. 15B

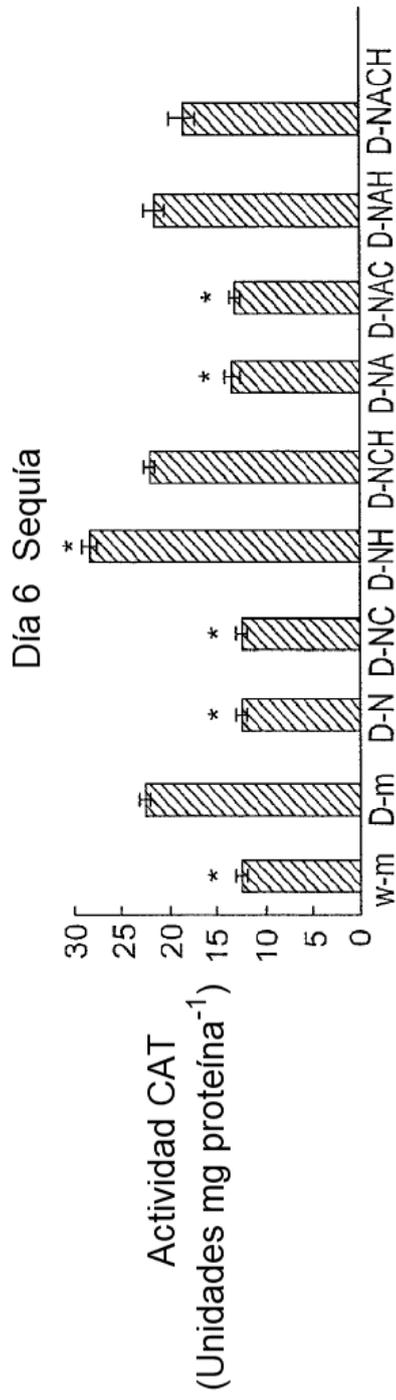


FIG. 16A-1

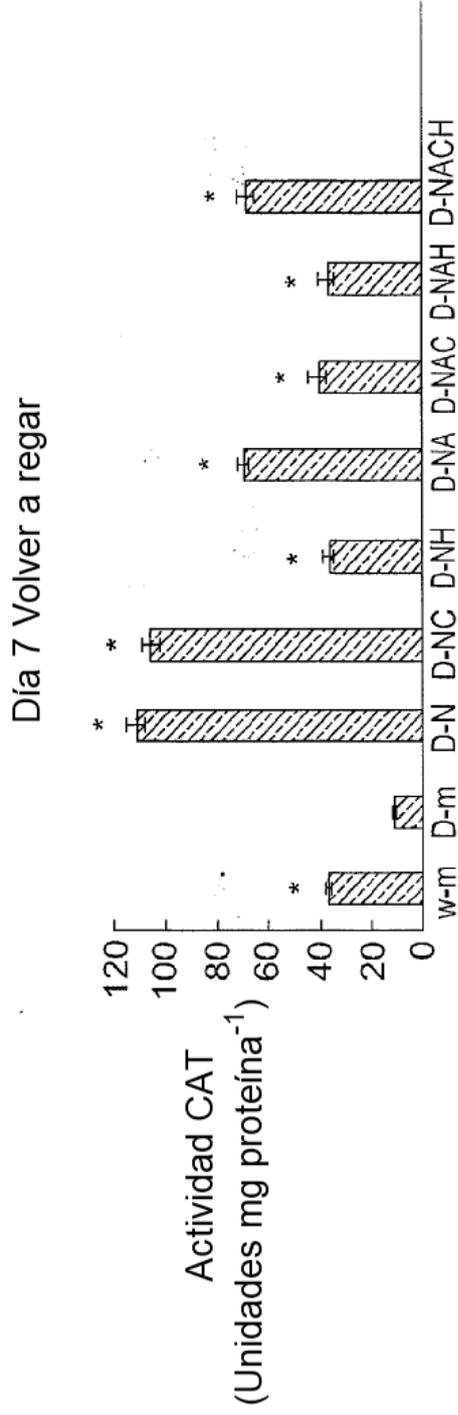


FIG. 16A-2

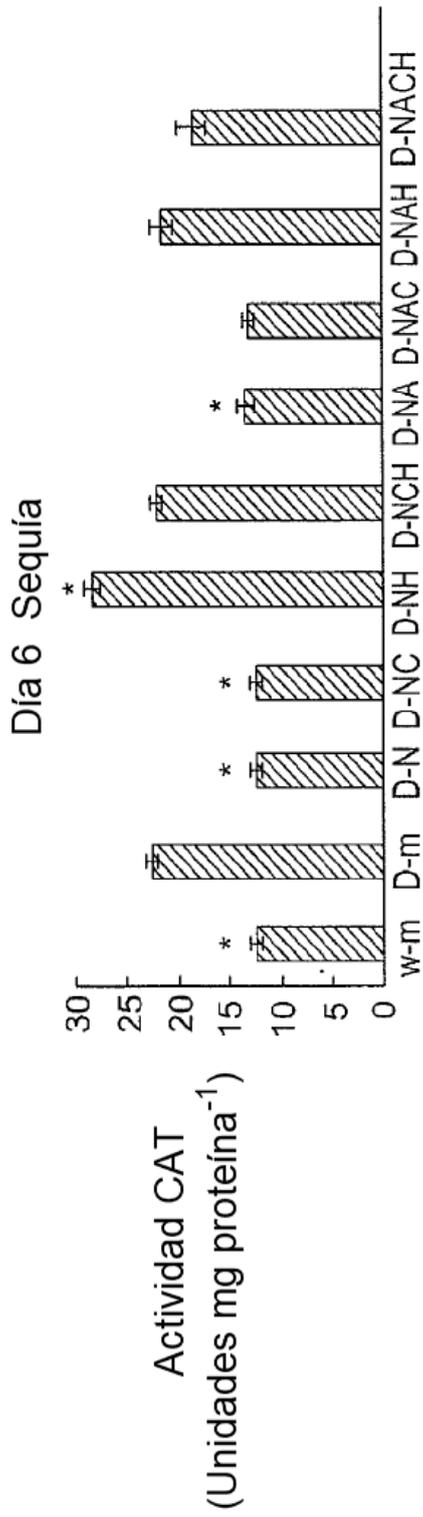


FIG. 16B-1

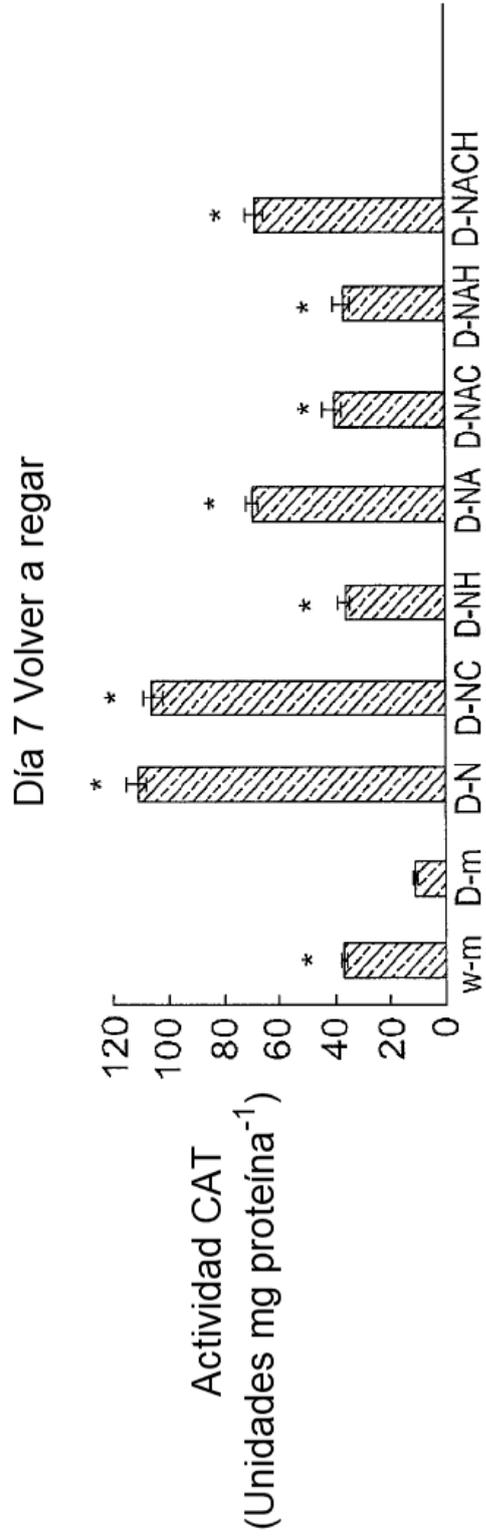


FIG. 16B-2

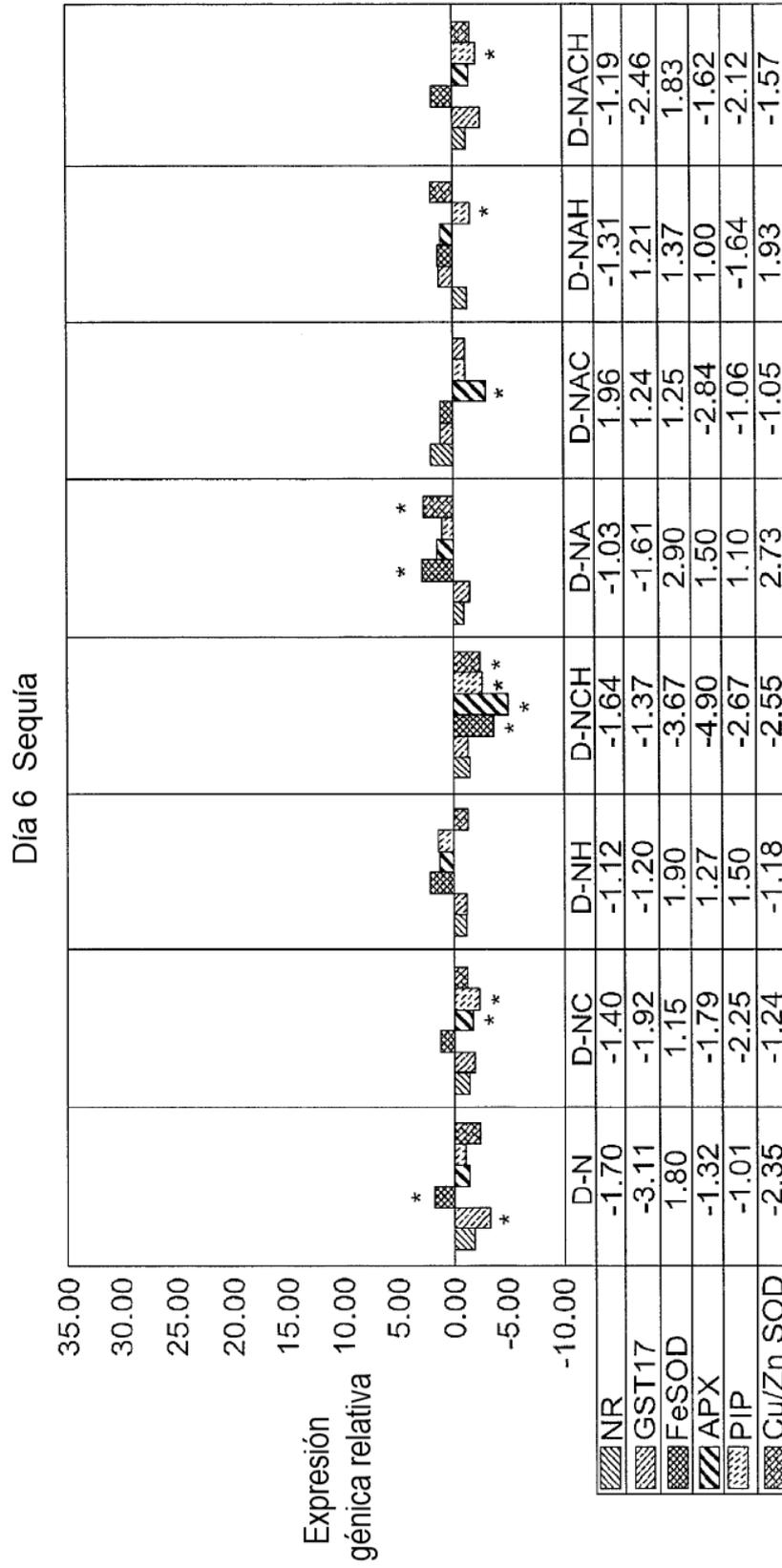


FIG. 17A

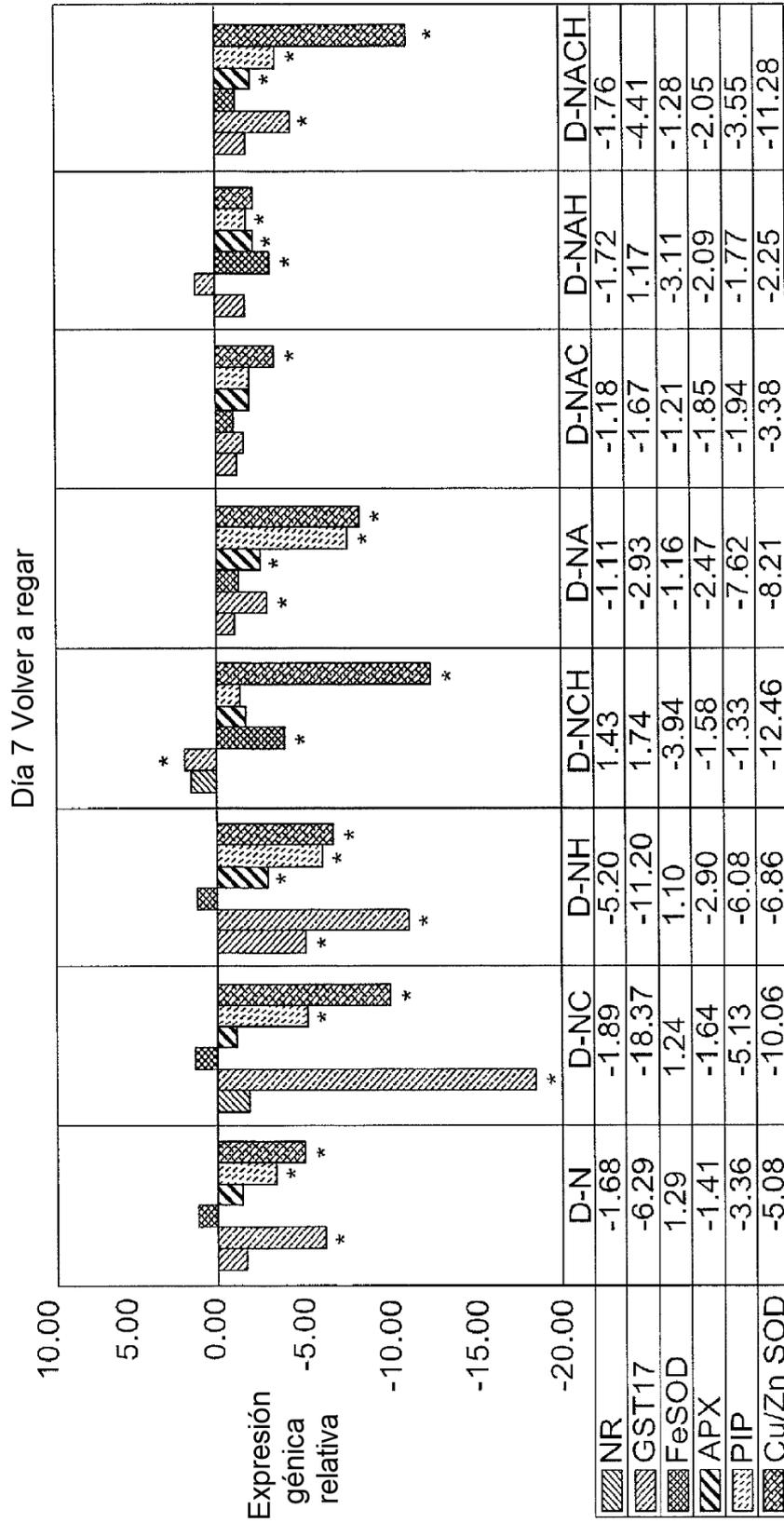


FIG. 17B

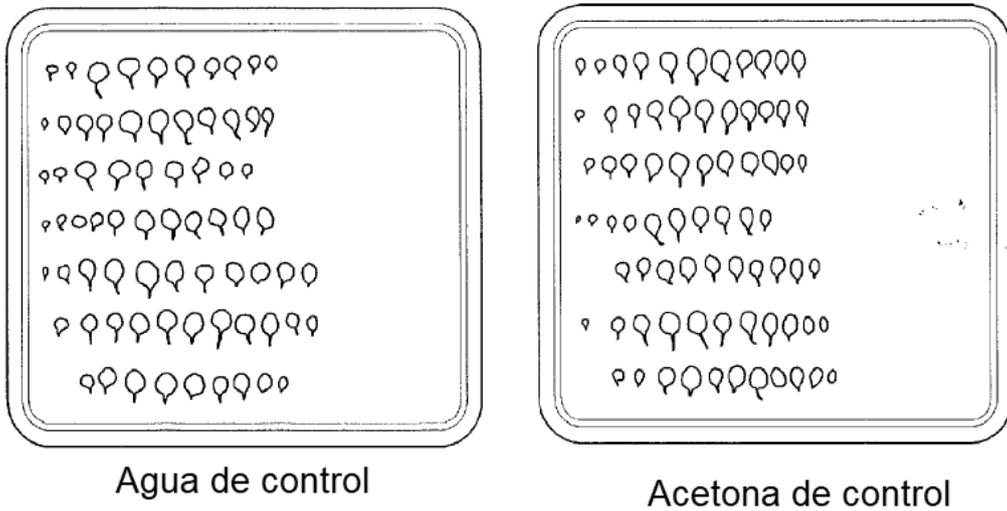


FIG. 18

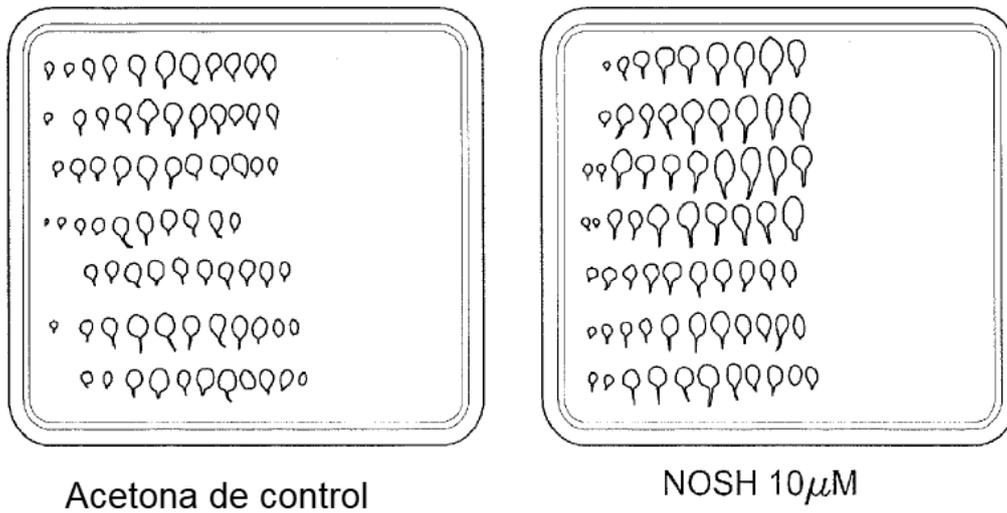


FIG. 19

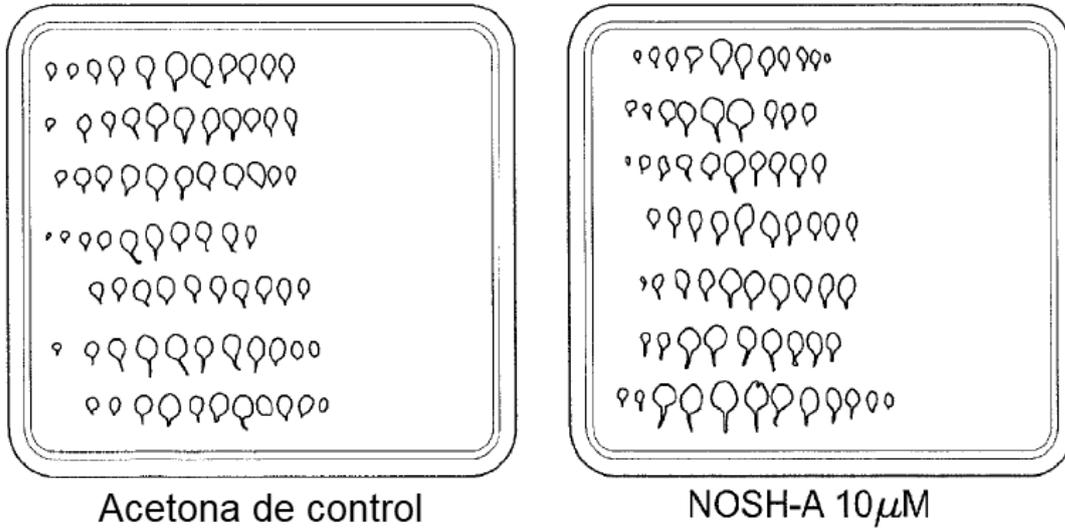


FIG. 20

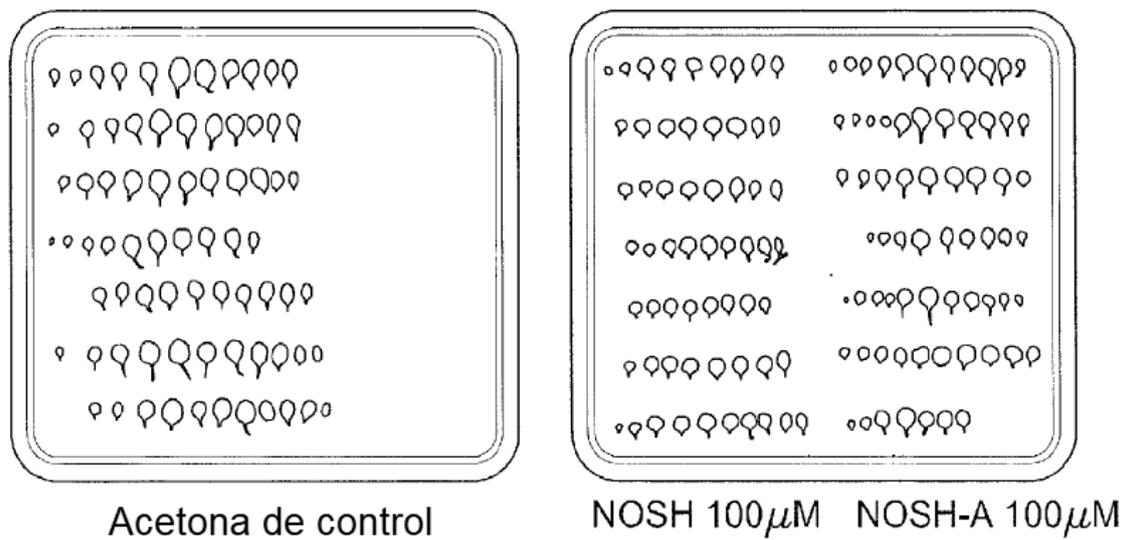


FIG. 21

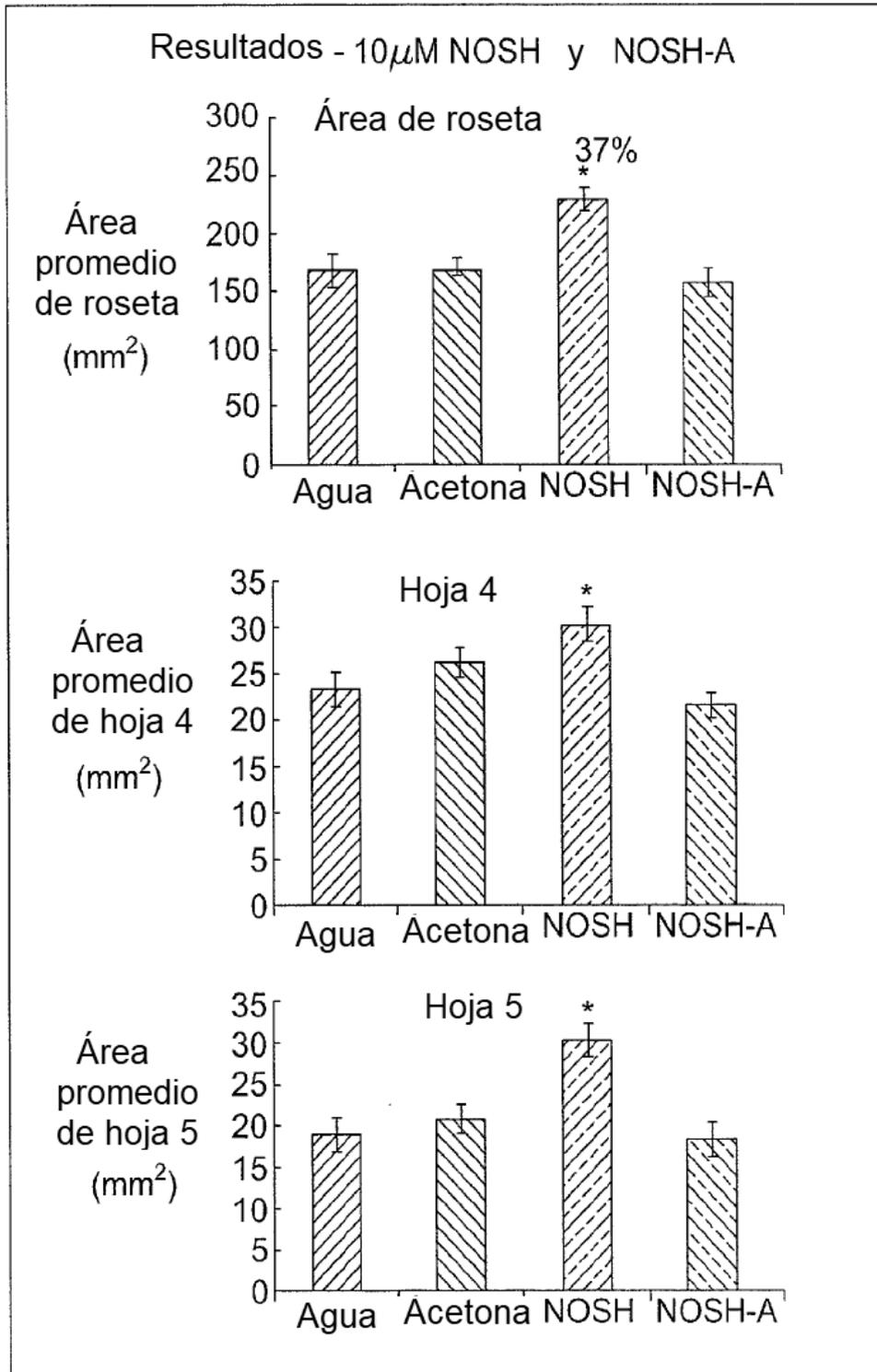


FIG. 22