

Aspirina: Estructura y Acción Farmacológica

Juan R. de XAMMAR ORO *, M^a. Cristina DONNAMARIA y J. Raúl GRIGERA

*Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB),
CONICET-CIC-UNLP. C.C. 565, B1900AVW, La Plata, Argentina.*

RESUMEN. La aspirina (ácido acetilsalicílico) es uno de los medicamentos más viejos y difundidos del mundo. Son múltiples sus beneficios, pero recién en los últimos años se han comenzado a desentrañar los mecanismos moleculares por los que consigue tan amplia gama de efectos. En este trabajo se discuten dichos mecanismos y su relación con su estructura dinámica.

SUMMARY. "Aspirin: Its Structure and Pharmacological Actions". Aspirin (acetylsalicylic acid) is one of the oldest and more widely known medicaments all over the world. Its benefits are multiple but only recently the molecular mechanisms of its action have been found out. In this paper the possible mechanisms and its relationship with its structure and dynamics are discussed.

BREVE RESEÑA HISTÓRICA¹⁻³

La variedad de efectos terapéuticos que se atribuyen a la aspirina surgen de las propiedades que le da su particular estructura molecular. El más conocido es como calmante del dolor. El dolor y la inflamación están íntimamente relacionados, ya que el primero es una de las manifestaciones cardinales de la inflamación. La aspirina pertenece al grupo de sustancias antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) y su uso inicial se remonta a los tiempos hipocráticos. Hace algo más de 2.300 años Hipócrates aconsejaba tomar té a base de corteza de sauce (*Salix alba* L.), fuente de salicilatos, para tratar la fiebre y el dolor. En 1763 Stone, escribiría "... *he descubierto que la corteza del árbol sauce llorón tiene propiedades astringentes, resultando además muy eficaz para calmar dolores y bajar la fiebre*". Pero ni el fundador de la medicina ni Stone sabrían nunca que habían encontrado el principio básico de la aspirina, los salicilatos. En 1828 Buchner consiguió aislar salicilina en forma de cristales y poco después Leroux lograba mejorar el método de extracción. En 1833 Merck obtenía un destilado de salicilina a la mitad del

costo de los extractos impuros de corteza conseguidos hasta ese momento. Cinco años más tarde Piria bautizó a la sustancia obtenida por Merck como "ácido salicílico". En 1835 Löwig cristalizó una sustancia que denominó "spirsäure" (ácido de salicilina) a partir de aceite de "reina de los prados" (*Spiraea ulmaria* L.), planta rica en salicilatos. Cuatro años más tarde Dumas demostró que el "spirsäure" no era sino ácido salicílico. En 1844 Cahours demostró que el aceite de brezos, por entonces remedio tradicional para la fiebre, contenía el éter metílico del ácido salicílico.

En 1860 Kolbe *et al.* sintetizaron ácido salicílico y su sal sódica a partir del fenol, bióxido de carbono y sodio; esto generó una verdadera revolución y fuerte baja de su precio, lo que provocó un aumento inmediato en el empleo del producto para tratar enfermedades. En 1876 se comprobó su éxito para el tratamiento de la fiebre reumática, dado en fuertes dosis, de hasta seis gramos. El empleo para tratar la gota y la artritis fue impulsado en París por Sée un año más tarde.

Sin embargo la aspirina entró en escena más

PALABRAS CLAVES: AINEs, Analgésico, antiinflamatorio, Aspirina, Prostaglandinas, Trombosis.

KEY WORDS: Analgesic, Antiinflammatory, Aspirin, Prostaglandins, Thrombosis, NSAIDs

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: xammar@usa.net; xammar@iflysib.unlp.edu.ar

de veinte años después de la popularización de los salicilatos. Su historia comienza en 1898 con el padre artrítico de un químico de la Fábrica de Anilinas Bayer de Alemania, Félix Hoffman, que no toleraba el salicilato de sodio porque le provocaba serios trastornos estomacales. Por ese motivo Hoffman estudió toda la literatura existente buscando derivados menos ácidos de la citada droga. Así dio con el ácido acetilsalicílico y comenzó a probarlo con su progenitor, comprobando con alegría que su efecto analgésico se potenciaba a la vez que los trastornos estomacales disminuían. La compañía bautizó la nueva droga "aspirin", tomando la "a" de acetyl y "spirin" de "spirsäure". A fines del siglo XIX no había industria química en el mundo que pudiera competir con Bayer en materia de analgésicos-antiinflamatorios. Desde entonces la aspirina no dejó de utilizarse; por el contrario, en las últimas décadas continuamente se descubren nuevas propiedades farmacológicas. Pero una cosa es encontrar posibles efectos beneficiosos de un medicamento y otra es probarlos fehacientemente.

ACCION FARMACOLOGICA

A sus antiguamente conocidas propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas se han añadido en los últimos decenios otros efectos muy útiles para la salud, como el de antiagregante plaquetario y, por lo tanto, antitrombótico. Por este efecto la aspirina se emplea en la profilaxis secundaria del infarto agudo de miocardio y de los accidentes cerebrovasculares tromboembólicos. También se utiliza en pacientes con riesgo de complicaciones tromboembólicas o para prevenir la reobstrucción en cirugía vascular.

Los fisiólogos renales descubrieron que dosis bajas de aspirina bloquean la excreción de ácido úrico en los riñones, elevando por tanto su concentración en la sangre, y que, paradójicamente, las dosis altas inducían la excreción renal del ácido úrico, disminuyendo sus niveles en la sangre. Esta última propiedad explicaba la eficiencia de los salicilatos en el tratamiento de la gota aguda y crónica. También se la comenzó a utilizar con éxito como profilaxis de la trombosis en los trasplantes renales ⁴.

Otra propiedad que actualmente se está estudiando es su acción de retardar o disminuir el componente inflamatorio en la enfermedad de Alzheimer ^{5,6} y otras patologías de demencia. Un estudio realizado entre los años 1976 y 1995 sobre una población de 90.000 estadounidenses

que tomaron una dosis de 4 a 6 comprimidos de 400 mg de aspirina por semana ha demostrado una significativa incidencia en la reducción de cáncer de colon.

Ceguera, la afección de la arteria coronaria y anomalías del riñón son complicaciones comunes de la diabetes; los beneficios de tomar una aspirina por día y disminuir así estos efectos son cada vez más aceptados ⁷.

MECANISMOS DE ACCION

A principio de la década de 1970 no había ninguna hipótesis sólida que explicara los mecanismos mediante los cuales los salicilatos ejercían sus múltiples efectos. Sólo se sabía con certeza que ellos mitigaban el dolor al actuar sobre los tejidos y nervios sensoriales asociados, a diferencia de la morfina, que ejerce su acción sobre el cerebro. Pero sí existía la duda acerca de si los salicilatos reducían la fiebre interviniendo directamente en los centros de la fiebre del hipotálamo o mediante acción periférica. Más difícil resultaba explicar por qué la aspirina inhibía la agregación de plaquetas. Y por qué algunos pacientes resultaban alérgicos a la misma desarrollando reacciones sobre la piel y/o pólipos nasales acompañados de estornudos y mucosidad.

En 1971 Vane ⁸ propuso la primera explicación convincente del mecanismo de acción de la aspirina. Había observado que a muchas formas de lesión hística seguía una liberación de prostaglandinas, familia de hormonas locales ubicuas que se producen por la oxidación enzimática del ácido araquidónico, ácido graso que se encuentra en las membranas celulares. Las prostaglandinas tienen multitud de funciones reguladoras: entre ellas el control del tono vascular, la contracción del útero y las funciones de las plaquetas. Las prostaglandinas no se almacenan en el interior celular, sino que se liberan si se lesionan las células o están sometidas al estímulo de otras hormonas. Además se había conseguido demostrar que dos grupos de prostaglandinas, la E₂ y la I₂, producían síntomas inflamatorios: enrojecimiento (vasodilatación) y calor (fiebre). Vane utilizó entonces ácido araquidónico marcado radioactivamente para demostrar que la aspirina y otras sustancias análogas inhibían la síntesis de prostaglandinas E₂ y F₂α. Por otra parte, las plaquetas obtenidas de voluntarios a los que se había administrado aspirina e indometacina eran incapaces de sintetizar prostaglandinas en respuesta al factor coagulante trombina.

De esta manera no había duda alguna del bloqueo de la síntesis de prostaglandinas por parte de la aspirina. Ahora faltaban estudiar los mecanismos en virtud de los cuales la aspirina inhibía la enzima que transformaba el ácido araquidónico en prostaglandinas. La prostaglandina sintetasa H, nombre actual de esa enzima, produce prostaglandinas estables (de la serie E, I y F) a través de los intermediarios inestables PGG₂ (prostaglandinas G₂) y PGH₂, descubierto por Samuelsson ⁹.

Hacia 1974 Ferreira y Vane ¹⁰ habían acumulado pruebas suficientes a favor de la hipótesis de las prostaglandinas. La conclusión era que la aspirina y otros salicilatos afines inhibían la enzima prostaglandina sintetasa.

La hipótesis de las prostaglandinas halla su apoyo más sólido en la explicación de los efectos colaterales clínicos de los AINEs. El más preocupante de ellos era la irritación y ulceración del estómago. Hoy se sabe que estos fármacos producen la irritación porque bloquean la síntesis de prostaglandinas que el revestimiento del estómago necesita para regular la síntesis excesiva de ácido y para fabricar la barrera mucosa que evita su autodigestión. Por otra parte, la mayoría de los AINEs impiden la excreción normal de sal y agua del organismo, en particular cuando una enfermedad cardíaca o hepática compromete el flujo de sangre hacia los riñones. Cuando los AINEs inhiben la síntesis de PGI₂ (prostaglandina que dilata los vasos sanguíneos) en los riñones, el aporte de sangre renal cae todavía más.

Otro efecto colateral de los AINEs (no así del salicilato sódico) es el síndrome de hipersensibilidad a la aspirina en pacientes genéticamente susceptibles. Por el bloqueo de la prostaglandina sintetasa, el ácido araquidónico toma otra vía metabólica que lo habrá de transformar en una serie de sustancias, especialmente los leucotrienos B₄, C₄, y D₄, que superan en potencia irritativa a los productos de la PGH sintetasa.

Finalmente, el efecto colateral más común de los AINEs, pero en especial de la aspirina, es su marcado efecto anticoagulante. Se dan casos de enfermos que toman estos fármacos y sufren hemorragias graves después de una extracción dental, una intervención quirúrgica menor o un traumatismo. La aspirina inhibe la agregación plaquetaria. Actúa bloqueando la producción de PGG₂ y PGH₂. Las plaquetas transforman a esta última en tromboxano B₂, vasoconstrictor más potente que interviene en la agregación plaque-

taria. En el ínterin, las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos aprovechan esos mismos intermediarios prostaglandínicos para sintetizar un potente vasodilatador, la prostaciclina o PGI₂.

Este efecto secundario proporcionó la base para el uso de la aspirina en la prevención de accidentes cerebrovasculares e infartos de miocardio. Dosis cuidadosamente calculadas pueden disminuir la producción de tromboxano sin afectar a la síntesis de prostaciclina. La aspirina inactiva irreversiblemente la PGH sintetasa. Las plaquetas no pueden fabricar más PGH sintetasa ni, por ende, más tromboxano. Las células endoteliales, sin embargo, sí pueden producir más PGH sintetasa, con lo que la síntesis de prostaciclina se inhibe sólo unos días.

De esta manera, la hipótesis de Vane de las prostaglandinas permitía explicar los efectos de dosis muy bajas (antitrombóticas) y medianas (analgésicas y antipiréticas) de aspirina. Sin embargo, la teoría de Vane de que la producción local de prostaglandinas causa el proceso inflamatorio se ha comprobado sólo en parte. El efecto antiinflamatorio de los salicilatos requiere dosis mucho mayores que el analgésico, discrepancia que mueve a pensar que, o bien la prostaglandina sintetasa celular -responsable de la inflamación- es relativamente insensible a la aspirina, o bien la aspirina debe sus funciones antiinflamatorias a un mecanismo de acción distinto al de su propia capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas.

En los últimos años Abramson *et al.* ¹¹ han puesto de manifiesto que las propiedades del salicilato sódico y del acetaminofeno corroboran la posibilidad de que las sustancias similares a la aspirina tengan efectos clínicos que no dependen de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. El salicilato sódico comparte muchas de las propiedades antiinflamatorias de la aspirina; ahora bien, a las concentraciones que habitualmente se alcanzan en el organismo, no es capaz de inhibir la síntesis de prostaglandinas en cultivos celulares trastornados. Tampoco inhibe las funciones plaquetarias, ni causa hemorragias. El fármaco analgésico y antipirético de mayor uso, el acetaminofeno, no bloquea la síntesis de prostaglandinas, ni impide el proceso de coagulación, ni tampoco reduce la inflamación. Es decir, dolor y fiebre remiten sin tener que inhibir la síntesis de prostaglandinas.

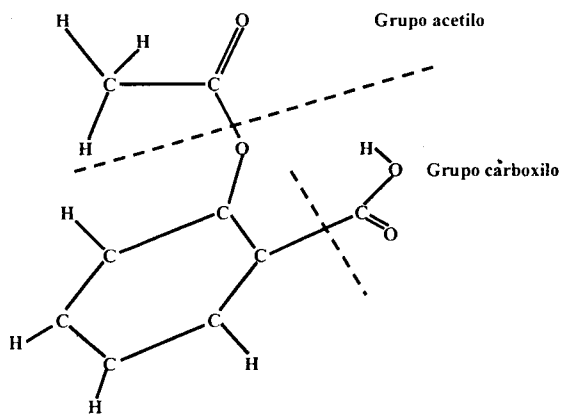
Abramson y Weissmann ¹² han propuesto un mecanismo alternativo que explicaría los efectos

antiinflamatorios de la aspirina y otros AINEs: su oposición al proceso de estímulo-respuesta relacionado con los neutrófilos. Estas células, las más abundantes en la inflamación aguda, constituyen la primera línea de defensa contra los intrusos y se encuentran entre las pioneras también en la producción de lesiones por enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoidea. Lesionan los tejidos al liberar enzimas capaces de degradar las proteínas (proteasas) y péptidos. A los cinco segundos de haber tomado contacto con las sustancias que generan la inflamación, los neutrófilos se transforman en células secretoras, listas a lesionar los tejidos. Uno de los primeros estadios en la aparición de lesión hística es la adhesión célula a célula de los neutrófilos, entre ellos y con las células que forman la pared de los vasos sanguíneos. Se ha observado que dosis terapéuticas de AINEs son capaces de inhibir estas adhesiones. En particular la aspirina tiene estos mismos efectos sobre los neutrófilos, además de producir la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Se puede concluir entonces que el efecto antiinflamatorio de la aspirina parece estar relacionado más con su acción sobre los neutrófilos que con su acción sobre las prostaglandinas.

ESTRUCTURA

La estructura cristalina de la aspirina (Fig.1) fue determinada por primera vez por Wheatley ¹³ y luego perfeccionada por Kim *et al.* ¹⁴ y más recientemente por Glaser ¹⁵.



Aspirina

C₉ H₈ O₄ PM = 180,15 C = 60%; H = 4,48%; O = 35,53%

Figura 1. Estructura molecular de la aspirina, compuesta por un anillo hidrofóbico de seis átomos de carbono y dos grupos hidrofílicos el carboxilo y el acetilo.

Además de los datos de NMR ^{16,17} y de simulación por dinámica molecular que los autores

están desarrollando, se ha comprobado que esta molécula, en solución, es conformacionalmente móvil. A pesar de su simplicidad, la aspirina muestra un cierto número de posibles conformaciones las cuales se corresponden con diferentes espectros de NMR.

La oscilación conformacional que se indica en la Figura 2 es una de la más claramente detectadas por estas técnicas, donde en una de ellas media la posibilidad de un enlace de hidrógeno distorsionado y por ende debilitado.

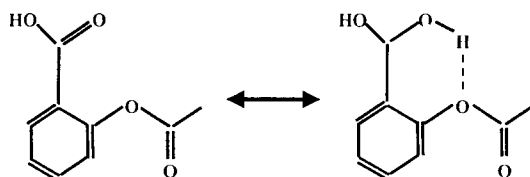
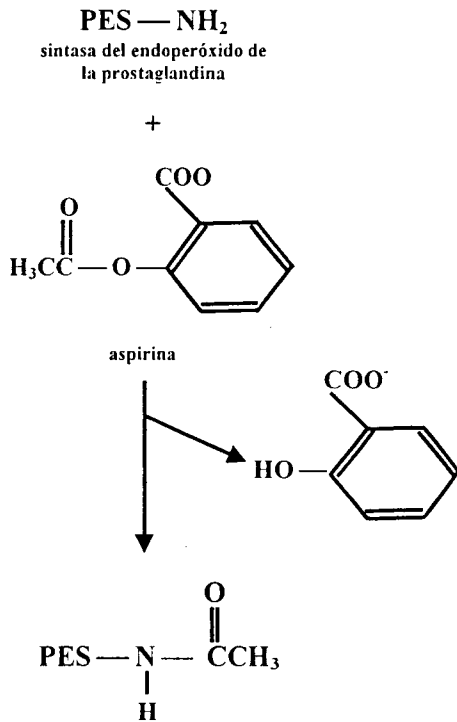


Figura 2. Oscilación conformacional más claramente detectada, donde en una de ellas media la posibilidad de un enlace de hidrógeno distorsionado y en consecuencia debilitado.

Si bien la simulación nos muestra una molécula no plana sugiere la existencia de estructuras adicionales de baja energía en las cuales podría llegar a adoptar una conformación prácticamente plana pero de baja probabilidad.

Debe tenerse en cuenta que la acción farmacológica de una droga no sólo depende de su estructura básica estática sino también de su movilidad y diferentes conformaciones que pueda tomar. A esto se llama "estructura dinámica".

Como ya hemos dicho, Vane determinó que la aspirina interfiere la biosíntesis de prostaglandinas, pero más recientemente Picot *et al.* ¹⁸ y Loll *et al.* ¹⁹ descubren la forma en que la aspirina interfiere esa biosíntesis, la cual depende de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1, aka PGH₂ sintasa 1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2, aka PGH₂ sintasa 2). La aspirina resulta ser un inhibidor de COX-1 y COX-2. La COX-1 actúa en la síntesis fisiológica normal de prostaglandinas y la COX-2 en las células con proceso inflamatorio. Además del dolor, las prostaglandinas están también involucradas en una variedad de otros procesos como la agregación de las plaquetas. Con el conocimiento de la estructura de tales enzimas y de la aspirina se hace posible ahora conocer en detalle cómo se produce la inhibición: la aspirina disminuye la velocidad de biosíntesis de prostaglandina al actuar como inhibidor del componente de ciclooxigenasa de la sintasa del endoperóxido. La inhibición es resultado de la modificación covalente de cierto grupo amino crucial en la enzima (Fig. 3)



Forma acetilada inactiva de la enzima

Figura 3. Esquema donde se grafica la reacción de la aspirina con la sintetasa del endoperóxido de la prostaglandina (PES). El grupo amino de la PES proviene del N terminal de una de las subunidades.

El anillo de seis átomos de carbono que constituye la mayor parte de la aspirina es de muy alta estabilidad y se manifiesta como altamente hidrofóbico, hecho que le permite penetrar en las membranas lipídicas y de esta manera alcanzar las prostaglandinas consideradas como proteínas integrales de membrana. Por otra parte debemos tener en cuenta que cuanto mayor es la acidez del medio, tal como sucede en las zonas de inflamación, mayor es la lipofilia. Esta hidrofobicidad es la que la hace poco soluble en agua y altamente soluble en solventes orgánicos: un gramo de aspirina se disuelve en 300 ml de agua, 17 ml de cloroformo, 12 ml de éter y 5 ml de alcohol, a 25 °C. Que la aspirina no sea totalmente hidrofóbica se debe a la presencia de los grupos acetilo y carboxilo que, al poseer la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, logran poner el balance hidrofóbico-hidrofílico en un punto que permite ese cierto grado de solubilidad.

HIPERSENSIBILIDAD

Una pequeña parte de la población es hipersensible a la aspirina y no puede tolerar ni si-

quiera pequeñas cantidades de la droga. Otros efectos adversos son: trastornos gastrointestinales, acidez gástrica, hemorragias y accidentes cerebrovasculares hemorrágicos. Pero debemos destacar que en la gran mayoría de las personas el uso de la aspirina no ocasiona problemas si se controla la presión arterial, la gastritis, la úlcera y el tiempo de coagulación sanguínea, sobre todo cuando se ingiere aspirina constantemente por tiempo prolongado y/o en altas dosis. Como toda droga debe controlarse y tomarse con precaución, dependiendo además de la reacción a la misma de cada paciente en particular.

La aspirina puede irritar el estómago, pero usándola amortiguada o con capa entérica se puede evitar ese efecto colateral. Amortiguada se libera en el estómago, pero contiene sustancias que contrarrestan la acidez y la irritación. Con capa entérica se libera el principio activo en el intestino delgado.

Los Niños y la Aspirina

Nunca debe administrarse aspirina (o medicamentos con salicilatos) a menores de 14 años cuando están bajo el proceso de una enfermedad viral, particularmente influenza o varicela. En esta situación la aspirina aumenta el riesgo de contraer el síndrome de Reye, encefalopatía aguda acompañada de un grave deterioro hepático que puede ser mortal, aunque no es contagioso. Por lo general, el síndrome surge durante la fase de recuperación de la enfermedad viral y al principio puede confundirse con muchos otros trastornos (encefalitis, meningitis, diabetes, intoxicación, enfermedades mentales o inclusive como abuso de drogas).

La enfermedad actualmente se describe según los estadios siguientes:

Estadio 0. Un niño que sigue una recuperación aparentemente normal de un proceso viral, de pronto comienza a sentirse irritable, con letargo o turbado.

Estadio 1. Luego sobrevienen accesos de náuseas y vómitos en forma continua.

Estadio 2. Horas o días más tarde el niño puede presentar hiperactividad o, por el contrario, letargia.

Estadio 3. En esta etapa puede aparecer delirio o estupor.

Estadio 4. Aparecen convulsiones.

Estadio 5. Caen en estado de coma, que puede agravarse hasta llegar a la muerte, la que puede presentarse súbitamente.

La recuperación depende del diagnóstico

temprano. Es importante llamar al médico de inmediato si se desarrolla cualquiera de esos síntomas, ya que debido a la baja incidencia anual del síndrome de Reye (7,1 casos por millón, en menores de 18 años, registrados en la década del 80, en EE.UU. y Gran Bretaña) no es frecuente que el profesional lo tenga en cuenta al hacer el diagnóstico inicial. Se desconoce la razón, pero la incidencia ha disminuido de manera sorprendente desde que se administra menos aspirina a los menores (3,7 casos por millón, en la década del 90, en esos mismos países). Un sustituto que suele recomendarse para los niños en lugar de la aspirina es el acetaminofeno (paracetamol).

PRECAUCIONES

Se aconseja evitar la ingesta de aspirina los 7 días previos a una intervención quirúrgica, ya que fluidifica la sangre; no dar aspirina a menores de 14 años cuando están afectados por una enfermedad viral, pues su uso ha sido ligado al síndrome de Reye; no tomarla si se sufre una enfermedad renal crónica; lo mismo si se tiene problemas hepáticos o de úlcera gástrica. Se desaconseja al inicio del embarazo e incluso se

prohíbe durante el tercer trimestre de gestación. También se desaconseja durante la lactancia, ya que el ácido acetilsalicílico pasa a la leche materna.

CONCLUSION

Los efectos de la aspirina están relacionados con su acción sobre la síntesis de prostaglandinas y sobre la agregación-adhesión de los neutrófilos.

Si bien es mucho lo que se avanzó en los últimos años en el conocimiento de su acción farmacológica resta aún bastante por descubrir en cuanto a su relación estructura-función.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y de los Departamentos de Ciencias Biológicas y de Química de la FCE-UNLP. J.R.de X.O. y J.R.G. son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET y Profesores de la FCE-UNLP, M.C.D. es miembro de Carrera del Investigador de la CIC.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Andermann, A.A.J. (1996) *McGill J. of Med.* **2**: 115-20. (Ver también: *Encyclopedia Americana* (1995) Vol. 2: 518-9 y www.aspirin-foundation.com/100year.htm)
2. Verg, E., G. Plumpe & H.Schultheis (1989) "Commemoration of Century of Aspirin's Release". *The Official Bayer Publication*. Leverkusen - Germany
3. Mc Tavish, J. (1987) *Bulletin of the History of Medicine, Am.Med. Assoc.* **61**: 364 -5
4. Roberston, A.J., V. Nargund, D.W. Gray & P.J. Morris (2000) *Nephrol. Dial Transplant.* **15**: (11) 1865-8
5. Pennisi, E. (1998) *Science* **280**: 1191-2
6. Schnabel, J. (1993) *Science* **260**: 1719-20
7. Rolka, D.B., A. Fagot-Campagna & K.M. Narayan (2001) *Diabetes Care* **24**:197-201
8. Vane, J.R. (1971) *Nature-New Biology* **231**: 232-5
9. Samuelsson, B. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 997-1029
10. Ferreira, S.H. & J.R. Vane (1974) *Annu. Rev. Pharmacol.* **14**: 57-73
11. Abramson, S., H. Korchak, R. Hedelson, K. Haines, R. Levin, R. Herman, L. Rider, S. Kimmel & G. Weissmann (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 7227-31
12. Abramson, S. & G. Weissmann (1989) *Arthritis and Rheumatism.* **32**: 1-9
13. Wheatley, P.J. (1964) *J. Chem. Soc.* 6036-41
14. Kim, Y.; K. Machida, T. Taga & K. Osaki (1985) *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2641-7
15. Glaser, R. (2001) *J. Org. Chem.* **66**: 771-9
16. Detken, A. (1998) *J. Chem. Phys.* **108**: 5845-54
17. Detken, A. (1998) *J. Chem. Phys.* **109**: 6791-9 (ver tambien: Abraham, R.J. (1999) *University of Liverpool Dept. Chemistry* www.liv.ac.uk/chemistry/staff/abrahamglaxoskb)
18. Picot, D, P.J. Loll & R.M. Garavito (1994) *Nature* **367**: 243-9
19. Loll, P.J., D. Picot & R.M. Garavito (1995) *Nature Struct. Biol.* **2**: 637-43