

Mecanismo molecular de resistencia a fármacos en parásitos

Molecular mechanism of drug resistance in parasites

GAMARRO, F. y CASTANYS, S.

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". C.S.I.C. C/Ventanilla 11. 18001 Granada. E-mail: gamarro@ipb.csic.es

RESUMEN

El mecanismo de resistencia a fármacos es un proceso multifactorial, en el que pueden coexistir varios mecanismos, entre ellos: modificaciones en la entrada del fármaco, inactivación del fármaco, amplificación de genes que codifican para las proteínas blanco de acción o proteínas implicadas en la eliminación del fármaco al exterior celular, mutaciones en la proteína blanco de acción, y reparación del daño celular. En los últimos años, nuestro grupo ha estudiado sobre los protozoos parásitos *Leishmania* (*L. tropica* y *L. infantum*) y *Trypanosoma cruzi*, algunos de estos mecanismos, con especial interés en las proteínas transportadoras pertenecientes a la superfamilia ABC (ATP-binding cassette), conocidas como Glicoproteínas-P, implicadas en la eliminación de fármacos y sustancias tóxicas. El estudio molecular y funcional de estos mecanismos, facilitará el desarrollo de estrategias alternativas de tratamiento a emplear en casos de resistencia a fármacos en parásitos.

Palabras Clave: Parásitos, fármacos, mecanismos de resistencia.

ABSTRACT

Drug resistance is a multifactorial process involving different coexistent mechanisms, among them: modifications of drug entry, intracellular inactivation of drug, amplification of genes coding for target proteins or proteins involved in drug efflux, mutations in target proteins and increased repair of cell damage. Last years, our research group has been involved in the study of drug resistant mechanisms in the protozoan parasites *Leishmania* (*L. tropica* y *L. infantum*) and *Trypanosoma cruzi*. Our focus has been related with the study of transporters included in the superfamily ABC (ATP-binding cassette), specifically the P-glycoproteins involved in efflux of drugs and xenobiotics. Molecular and functional studies of these mechanisms, will help significantly the development of treatment alternative strategies to use in case of drug resistance in parasites.

Key words: Parasites. Drugs. Drug resistance mechanism.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 137-149]

INTRODUCCIÓN

Desgraciadamente, y hasta el momento, el tratamiento quimioterápico constituye la principal línea de defensa frente a las enfermedades parasitarias. Los fármacos de una forma general, para ejercer su acción sobre los parásitos deben: alcanzar al parásito y posteriormente interactuar con su blanco de acción dentro del parásito.

Para esto el fármaco debe atravesar la membrana plasmática del parásito, con frecuencia debe ser activado en el interior celular y finalmente debe unirse con su proteína blanco de acción. A continuación, el parásito debe verse lo suficientemente afectado para morir de forma espontánea o ser destruido por el sistema defensivo del hospedador. Todas estas etapas proveen al parásito de diferentes oportunidades para interferir con la acción de los fármacos, llevando al fenómeno de *resistencia*. Se ha descrito resistencia a fármacos en las enfermedades producidas por organismos infecciosos desde virus hasta parásitos, constituyendo un gran problema de salud pública al que tendremos que enfrentarnos en esta última parte de la década y en el próximo siglo XXI. Ejemplo de resistencia a fármacos lo constituye la resistencia a la cloroquina, fármaco empleado en el tratamiento de la Malaria. En muchas áreas endémicas de Malaria, la resistencia a la cloroquina es tan prevalente que el empleo de la misma no se recomienda.

Hay que admitir que pueden ser varias las causas por las que tiene lugar el fallo en el tratamiento terapéutico de muchas enfermedades parasitarias: biotransformación del fármaco en el interior celular, inaccesibilidad de los fármacos a los lugares de localización parasitaria, factores genéticos o inmunológicos, calidad del producto, y el desarrollo por el parásito de eficaces mecanismos de resistencia.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Algunos de los mecanismos de resistencia que un parásito puede desarrollar aparecen en este esquema (Fig. 1):

Los parásitos pueden desarrollar mecanismos que van dirigidos a alterar o modificar la entrada del fármaco en el interior celular, bien por mutaciones o modificaciones en el transportador o bien por modificaciones en la permeabilidad de la membrana plasmática por cambios en su composición-estructura.

Otro mecanismo muy característico de protozoos parásitos (género *Leishmania*), es la amplificación de genes que codifican bien para proteínas blanco de acción del fármaco o bien proteínas transportadoras implicadas en la salida de fármaco del interior celular.

Los parásitos pueden desarrollar mecanismos que bloquean o inactivan al

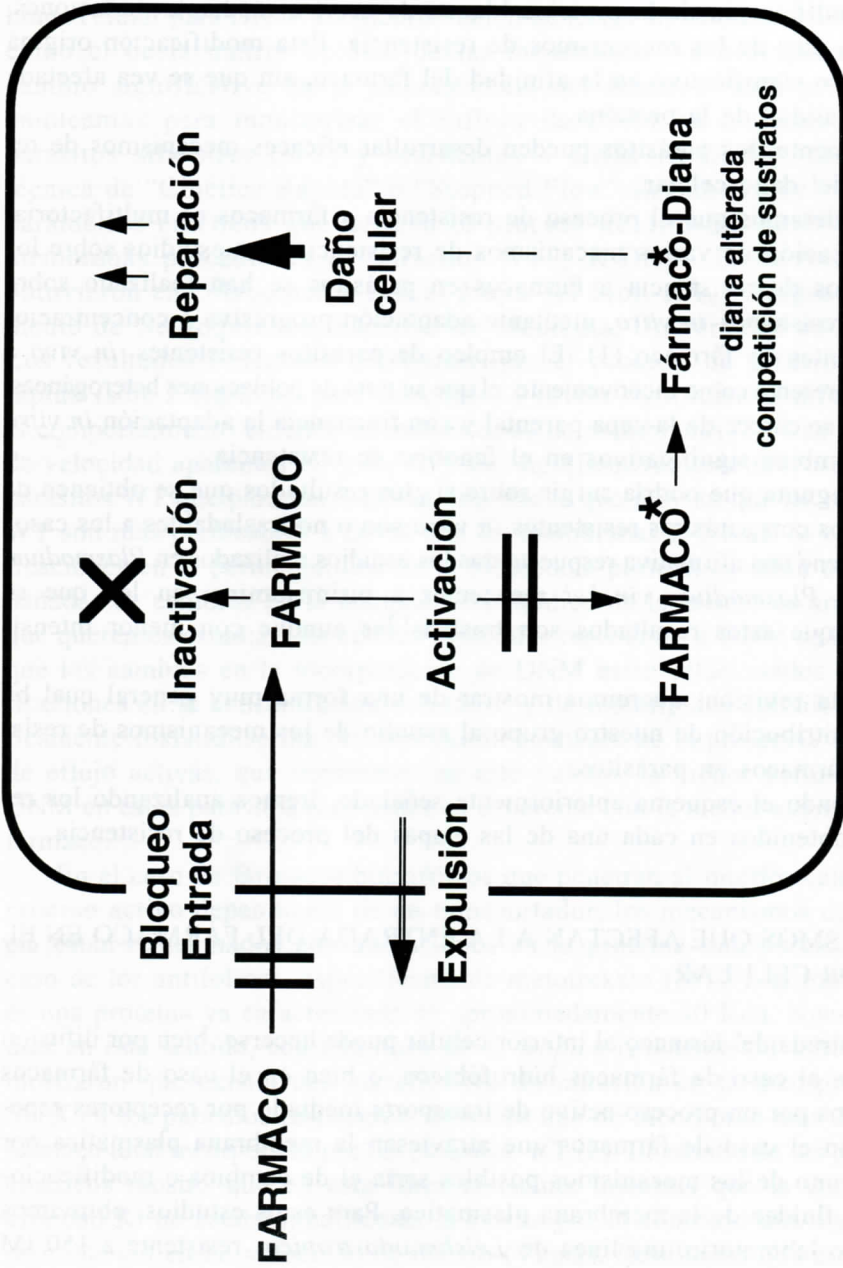


Fig. 1.—*Mecanismos de resistencia a fármacos en parásitos.* Los parásitos pueden desarrollar, entre otros, los siguientes mecanismos: bloqueo de la entrada del fármaco; expulsión del fármaco al exterior celular a través de las proteínas transportadoras ABC; inactivación del fármaco; mutaciones en la proteína blanco de acción y reparación del daño celular.

fármaco mediante modificaciones en el pH citoplasmático o mediante la conjugación del fármaco con glutation/tripanonotio.

La modificación de la proteína blanco de acción, mediante mutaciones, constituye otro de los mecanismos de resistencia. Esta modificación origina un descenso significativo en la afinidad del fármaco, sin que se vea afectada la funcionalidad de la proteína.

Finalmente, los parásitos pueden desarrollar eficaces mecanismos de reparación del daño celular.

Consideramos que el proceso de resistencia a fármacos es multifactorial con implicación de varios mecanismos de resistencia. Los estudios sobre los mecanismos de resistencia a fármacos en parásitos se han realizado sobre parásitos resistentes *in vitro*, mediante adaptación progresiva a concentraciones crecientes de fármaco (1). El empleo de parásitos resistentes *in vivo* a fármacos presenta como inconveniente: el que se trata de poblaciones heterogéneas, a menudo se carece de la cepa parental y con frecuencia la adaptación *in vitro* origina cambios significativos en el fenotipo de resistencia.

La pregunta que podría surgir sobre si ¿los resultados que se obtienen de los estudios con parásitos resistentes *in vitro* son o no trasladables a los casos *in vivo*?, tiene una afirmativa respuesta tras los estudios realizados en *Plasmodium berghei* y *Plasmodium vinckei* resistentes a pirimetamina, en los que se demostró que estos resultados son trasladables aunque con menor intensidad (2).

En esta revisión, queremos mostrar de una forma muy general cual ha sido la contribución de nuestro grupo al estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos en parásitos.

Siguiendo el esquema anteriormente señalado, iremos analizando los resultados obtenidos en cada una de las etapas del proceso de resistencia.

MECANISMOS QUE AFECTAN A LA ENTRADA DEL FÁRMACO EN EL INTERIOR CELULAR

La entrada del fármaco al interior celular puede hacerse: bien por difusión pasiva, en el caso de fármacos hidrofóbicos, o bien en el caso de fármacos hidrofílicos por un proceso activo de transporte mediado por receptores específicos. En el caso de fármacos que atraviesan la membrana plasmática por difusión, uno de los mecanismos posibles sería el de cambios o modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática. Para estos estudios, obtuvimos en nuestro laboratorio una línea de *Leishmania tropica* resistente a 150 μ M de daunomicina (DNM).

DNM es una antraciclina cuyo transporte al interior celular ocurre por difusión pasiva. Es un fármaco fluorescente, que absorbe a 540/590 nm.

Cualquier cambio o modificación en la estructura o composición de la bicapa lipídica podría reflejar un cambio en la permeabilidad de la membrana celular para DNM. La incorporación de DNM en ambientes hidrofóbicos como el de la matriz lipídica de las membranas, va acompañada de un cambio significativo en la fluorescencia del fármaco. Esta propiedad la empleamos para monitorizar el influjo de DNM en las membranas de parásitos silvestres (WT) y resistentes a DNM (R-DNM). Mediante la técnica de "Cinética Rápida" o "Stopped Flow" llegamos a cuantificar los parámetros cinéticos que definen el proceso de difusión de DNM en las membranas procedentes de parásitos WT y R-DNM. Estos resultados se obtuvieron en colaboración con el grupo del Prof. J.A. Ferragut (Departamento de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Alicante). Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de difusión es muy rápido (sólo 2 segundos para detectarlo) y revela significativas diferencias en el comportamiento cinético de ambos tipos de membranas (3). Las constantes de velocidad aparentes K_1 y K_2 (s^{-1}) son significativamente mayores para los parásitos WT que para los R-DNM, resultados que indican que las membranas WT son más permeables a DNM que las membranas R-DNM. Si estas modificaciones en la permeabilidad de la membrana plasmática están o no acompañadas de cambios en la composición lipídica de la misma es una cuestión que queremos estudiar. En células tumorales resistentes a DNM se ha descrito que los cambios en la incorporación de DNM están relacionados con modificaciones en la concentración de colesterol y de fosfolípidos aniónicos, específicamente fosfatidilserina (4). Independientemente de la presencia de bombas de eflujo activas, que trataremos en este trabajo, la menor permeabilidad a DNM en estos parásitos resistentes es coherente con la menor acumulación de fármaco.

En el caso de fármacos hidrofílicos que penetran al interior celular en un proceso activo dependiente de un transportador, los mecanismos de resistencia están relacionados con alteraciones en la proteína transportadora. En el caso de los antifolatos, específicamente metotrexato (MTX), el transportador es una proteína ya caracterizada de aproximadamente 40 Kda. Nuestros estudios en este sentido, con una línea de *L. tropica* resistente a 1 mM de MTX, mostraron que existía una significativa disminución en la incorporación de MTX en los parásitos resistentes, de modo que no incorporan más del 3% del fármaco total incorporado por los parásitos WT (5). El estudio de los parámetros cinéticos mostró que en esta línea resistente mientras que la constante de afinidad K_t no estaba modificada, sí existía por el contrario una significativa disminución en la velocidad de influjo (V_{max}). Resultados que nos llevaron a concluir que estas líneas resistentes presentaban como principal mecanismo de resistencia una alteración en el transporte del fármaco a nivel de la proteína transportadora.

AMPLIFICACIÓN GÉNICA

Es un mecanismo muy característico de respuesta a fármacos en protozoos parásitos, específicamente en *Leishmania*. Conlleva a la amplificación de genes que codifican a la proteína blanco de acción del fármaco o bien a proteínas transportadoras implicadas en la eliminación de fármacos al exterior celular. *Leishmania* tiene una gran plasticidad cromosómica que le permite amplificar genes en forma de elementos extracromosomales bien circulares o bien como moléculas lineales, incrementando así la expresión de las proteínas codificadas por dichos genes. El primer caso descrito de amplificación génica como respuesta a fármacos fue en el año 1987 por el grupo de D. V. Santi en San Francisco (U.S.A.) (6). Describieron en una línea de *Leishmania major* resistente a MTX la presencia de 2 amplicones circulares llamados círculos R y H. El círculo R de 30 kb, contenía al gen timidilato sintasa-dihidrofolato reductasa. El círculo H cuyo tamaño oscila entre 60-80 kb, contiene 2 genes: un gen *ptr1* que codifica para una pteridín reductasa, y otro gen *ltpgpA* perteneciente a las proteínas transportadoras de la superfamilia ABC, implicadas en la resistencia a arsenito y oxianiones. Se ha descrito en *Leishmania* la presencia de elementos circulares extracromosomales como respuesta a diferentes fármacos: tunicamicina, difluorometil ornitina, daunomicina, vinblastina. Nuestro grupo ha descrito la presencia de elementos extracromosómicos circulares en *Leishmania infantum* resistente a MTX (7) y en *L. tropica* resistente a DNM (3) o Glucantime (8), fármaco de elección en el tratamiento de la Leishmaniasis. Algunos de estos elementos extracromosómicos contienen genes que codifican proteínas blanco de acción y/o genes que codifican proteínas transportadoras.

En general, los elementos extracromosomales son inicialmente inestables, poseen replicación autónoma y persisten mientras el fármaco está presente. Como decíamos, contienen genes que codifican para proteínas transportadoras. Una de las familias de transportadores celulares más amplia y diversa es la superfamilia ABC.

TRANSPORTADORES ABC

Todos los transportadores ABC se caracterizan por mediar el movimiento de moléculas a través de la membrana plasmática en contra de un gradiente de concentración, utilizando la energía liberada en la hidrólisis de ATP, y por la presencia de una secuencia altamente conservada en sus dominios de unión a nucleótidos o "ATP-Binding Cassette", característica que da nombre a esta superfamilia de ATPasas transportadoras.

La superfamilia ABC se encuentra muy representada en procariotas, sien-

do los sistemas de captación de bacterias o también llamados sistemas de transporte dependiente de unión a proteína, los primeros transportadores ABC que se han descrito. Se conocen más de 100 transportadores ABC y cada vez son más los transportadores eucariotas que se incorporan a la lista. A lo largo de toda la escala biológica se han descrito en:

Bacterias, donde llevan a cabo el transporte de sustratos como azúcares, iones inorgánicos, péptidos, polisacáridos, proteínas.

Levaduras, el más estudiado es el transportador STE-6, cuya función es llevar a cabo el transporte al exterior celular de la feromona denominada factor-a.

Protozoos. Se han descrito los genes glicoproteína-P (Pgp) de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania*, *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi*.

Nematodes. Se ha descrito los genes glicoproteína-P de *Caenorhabditis elegans*.

Insectos. Destacan los genes Pgp de *Drosophila melanogaster* y los transportadores del sistema White-Brown que tiene por sustrato pigmentos oculares.

Plantas. Se han descrito genes ABC cuya función se desconoce.

Células de mamíferos. Donde más se han estudiado los transportadores ABC. Se ha descrito los genes Pgp, el gen CFTR o gen de la fibrosis quística que actúa como canal de cloro y cuya mutación produce la enfermedad denominada fibrosis quística. Los genes Pgp MDR ("multidrug resistance") intervienen en el transporte de fármacos hidrofóbicos y diferentes sustancias tóxicas no relacionados estructural ni funcionalmente. Las proteínas TAP1 y TAP2 implicadas en el transporte de péptidos involucrados en la presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos.

Todos los transportadores ABC son muy parecidos estructuralmente. Están formados por cuatro dominios que interaccionan con la membrana, 2 de ellos son muy hidrofóbicos, son los dominios de transmembrana (TM) y los otros dos son hidrofílicos y contienen los dominios de unión a ATP (NBS) (Fig. 2). Cada TM está constituido, por lo general, por 6 segmentos transmembrana encargados de la unión al sustrato y de la correcta integración y acoplamiento a la membrana del transportador. En los NBS tiene lugar la hidrólisis del ATP y el acoplamiento de la energía liberada para el proceso de transporte (Fig. 3).

En algunos transportadores, principalmente procariotas, los 4 dominios son sintetizados como polipéptidos independientes que se organizan a nivel de membrana para formar el transportador, por ejemplo la permeasa de oligopéptidos de *Salmonella typhimurium*. En otros transportadores los dominios se encuentran fusionados en largos polipéptidos multifuncionales. Por ejemplo, el transportador de ribosa de *Escherichia coli* está constituido por 3 polipéptidos, 2 de ellos corresponden a los dominios TM y otro contiene a ambos NBS. En otros casos, los 4 dominios están fusionados en un solo

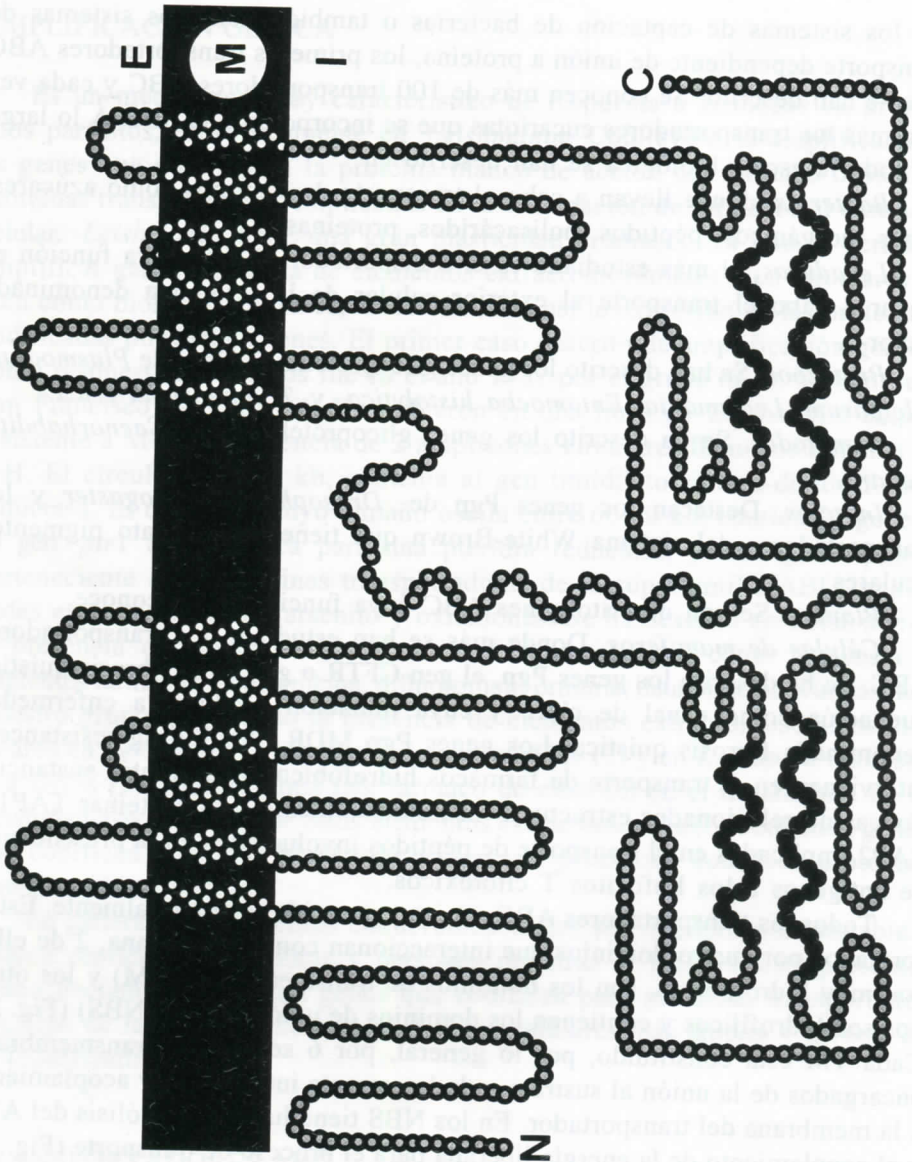


Fig. 2.—Modelo de un transportador ABC. La figura corresponde a una glicoproteína-P (Pgp) del protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. Presenta un tamaño de 1557 amino ácidos. La proteína podría subdividirse en 2 mitades homólogas, cada mitad está constituida por 6 dominios de transmembrana (círculos blancos) y un dominio de unión a ATP (círculos negros). Los segmentos de transmembrana están encargados de la unión al sustrato y de la correcta integración y acoplamiento a la membrana del transportador. En los dominios de unión a ATP tiene lugar la hidrólisis del ATP y el acoplamiento de la energía liberada para el proceso de transporte. N y C, extremos amino y carboxilo terminal de la proteína; I, espacio intracelular; E, espacio extracelular; M, membrana.

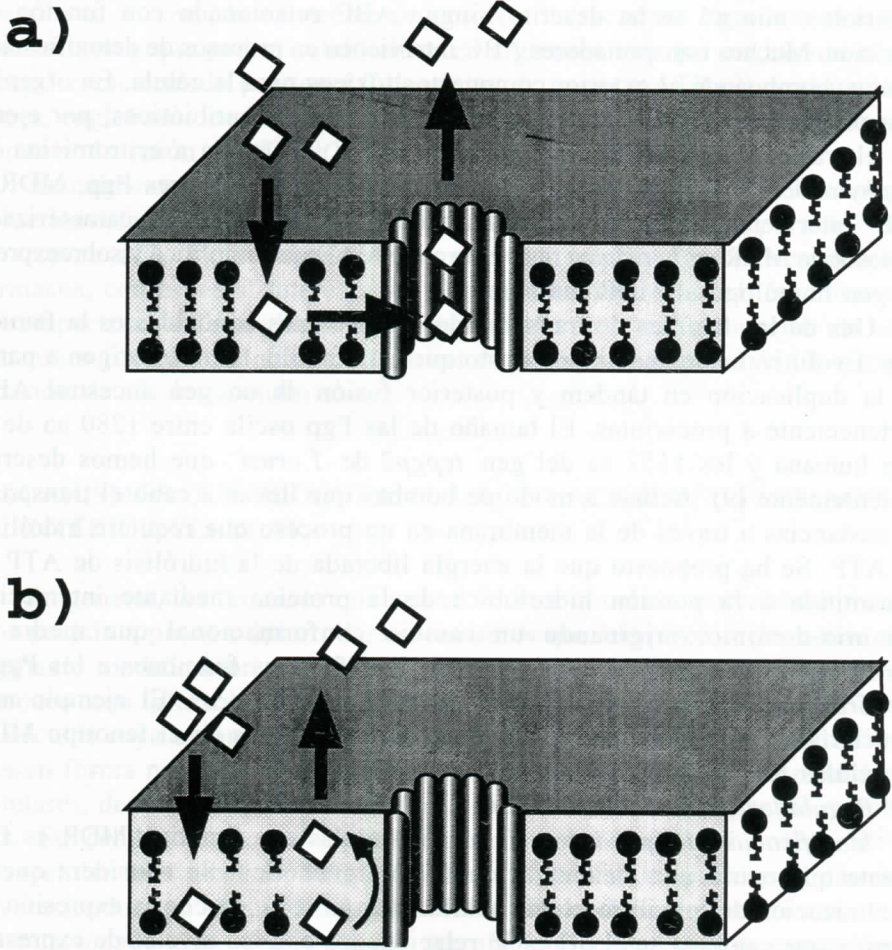


Fig. 3.—Modelo de actividad de una glicoproteína-P. Dos son los modelos de actividad de la glicoproteína-P más admitidos. Según el modelo a) de aspiradora hidrofóbica; los fármacos serían detectados y expulsados tan pronto como se hubieran incorporado a la membrana plasmática. En el modelo b) de flipasa; una molécula de fármaco situada en la capa interna de la membrana plasmática, se uniría a la glicoproteína-P y sería llevada a la capa lipídica externa (donde difundiría al exterior celular) o directamente al espacio extracelular por la glicoproteína-P, mediante un cambio conformacional de la proteína.

polipéptido como es el caso de las Pgp (Fig. 2) y el gen CFTR, que posee un quinto dominio, que interviene regulando la actividad del transportador.

La función de los transportadores es amplia por la gran variedad de sustratos que pueden transportar. En procariotas, destaca su función de transporte-captación de nutrientes, siendo capaces de almacenar altas concentraciones de sustrato en contra de un gradiente de concentración. En organismos

eucariotas, aún no se ha descrito ningún ABC relacionado con función de nutrición. Muchos transportadores ABC intervienen en procesos de detoxificación celular, bombeando al exterior compuestos tóxicos para la célula. En organismos procariotas, también intervienen en resistencia a antibióticos, por ejemplo el transportador MnR que interviene en la resistencia a eritromicina en *Staphylococcus*. En organismos eucariotas, los transportadores Pgp, MDR y MRP intervienen en resistencia a fármacos. Nuestro grupo ha caracterizado un fenotipo MDR en *L. tropica* resistente a DNM (3) que amplifica y sobreexpresa un gen homólogo al MDR humano.

Una de las familias de transportadores ABC más conocidas es la familia Pgp. Evolutivamente, se ha propuesto que esta familia tiene su origen a partir de la duplicación en tándem y posterior fusión de un gen ancestral ABC perteneciente a procariotas. El tamaño de las Pgp oscila entre 1280 aa de la Pgp humana y los 1557 aa del gen *tcpgp2* de *T. cruzi* que hemos descrito recientemente (9). Actúan a modo de bombas que llevan a cabo el transporte de sustancias a través de la membrana en un proceso que requiere hidrólisis de ATP. Se ha propuesto que la energía liberada de la hidrólisis de ATP es transmitida a la porción hidrofóbica de la proteína mediante interacción dominio-dominio, originando un cambio conformacional que media la translocación del sustrato. Se han asociado diferentes funciones a las Pgps:

Transporte y eliminación de compuestos xenobióticos. El ejemplo más característico lo tenemos en la implicación de las Pgps en el fenotipo MDR de células tumorales.

Regulador de Canales de Cloro.

Modificación del pH intracelular. En células con fenotipo MDR es frecuente que exista una alcalinización del pH citosólico. Se considera que la alcalinización del pH intracelular podría estar en relación con la expresión de Pgps, y que cambios en el pH están relacionados con los niveles de expresión de Pgp.

GLICOPROTEÍNAS-P EN PARÁSITOS

En protozoos parásitos las Pgps constituyen una familia multigénica, al igual que se ha descrito en mamíferos, habiéndose caracterizado en *P. falciparum* 1 gen (Pfmdr1), en *E. histolytica* se han caracterizado 6 genes Pgps, 2 de ellos presentan alta homología con los genes MDR humano y de ratón. En *Leishmania* existe una significativa familia de genes Pgps, con al menos 6 miembros. Esta familia puede subdividirse en 2 grupos: un grupo que engloba a 1 gen Pgp que confiere un fenotipo MDR (10), y otro grupo que engloba a 5 genes Pgps no MDR, de los que solo se conoce la función del gen PgpA implicado en resistencia a arsenito y antimonio (11). Recientemente, nuestro grupo ha

descrito en *T. cruzi* la existencia de una familia de genes Pgps con al menos 4 miembros y que podría subdividirse en 2 grupos: uno que englobaría al gen *tcpgp2* caracterizado por tener 2 dominios de unión a ATP (9), y al menos 3 genes, englobados en la familia *tcpgp1* y caracterizados por presentar un solo dominio de unión a ATP (12).

Actualmente, nuestro grupo está llevando a cabo los estudios funcionales sobre los diferentes genes Pgps de *T. cruzi* (9) y sobre el gen *pgpE* y MDR de *L. tropica* (13, 3), al objeto de conocer su implicación en resistencia a fármacos, con especial interés a los fármacos habituales en el tratamiento de las respectivas enfermedades parasitarias, así como su implicación en otras funciones fisiológicas como podrían ser regulación de canales de Cl⁻ o modificación de pH intracelular.

MECANISMOS QUE BLOQUEAN LA ACTIVACIÓN DEL FÁRMACO EN EL INTERIOR CELULAR

En general, los fármacos una vez en el interior celular necesitan activarse. Los parásitos pueden desarrollar mecanismos que bloqueen dicha activación, mediante modificación del pH intracelular o bien mediante conjugación del fármaco con glutation/tripantonio. Muchos fármacos son bases débiles o moléculas cuya unión a estructuras celulares depende del pH. Muchos fármacos en forma neutra son hidrofóbicos y atraviesan fácilmente las membranas celulares, dentro del citosol se protonan dificultando su paso por las membranas. En células tumorales resistentes, se ha observado que poseen un pH intracelular más alcalino, lo que conlleva a que no se protone el fármaco, favoreciéndose su salida al exterior celular. Como decíamos anteriormente, se ha relacionado esta alcalinización del pH intracelular con la expresión de Pgps. Estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que bajo nuestras condiciones experimentales, usando el marcador fluorescente BCECF sensible a pH, no existen diferencias significativas en el pH intracelular en parásitos (*L. tropica*) resistentes a diferentes fármacos, con respecto a parásitos control.

Otra forma de bloquear la activación de los fármacos es mediante la conjugación con glutation (GSH)/tripantonio T[SH₂] (en Tripanosomatidae). Se ha descrito en células de mamíferos que existe una familia de glutation-S-transferasas que catalizan la unión del glutation con los fármacos o metabolitos tóxicos. Constituyéndose un complejo conjugado con glutation que hace al producto menos tóxico para la célula y más fácilmente eliminado al exterior celular. En parásitos, la implicación de estos tioles GSH/T[SH₂] en el mecanismo de detoxificación celular se desconoce. Nuestro grupo, recientemente ha demostrado la implicación de estos tioles en el mecanismo de

resistencia a Glucantime en *L.tropica* (8). Existen evidencias de que la eliminación de estos conjugados se realice a través de una bomba GS-X-pump. Bombas que están presentes en la membrana plasmática, interviniendo en un proceso de transporte dependiente de ATP. Estudios recientes sugieren que esta GS-X-pump sea un transportador ABC (14).

En resumen y para finalizar, los parásitos son capaces de desarrollar mecanismos muy diferentes para resistir la acción de los fármacos empleados en el tratamiento quimioterápico de las enfermedades que producen. La estrategia racional de lucha en casos de resistencia, esta centrada en los estudios dirigidos a conocer los mecanismos de resistencia que permitirán diseñar estrategias alternativas de tratamiento, entre las que se encontraría el empleo de sustancias revertidoras/quimiosensibilizadoras del fenotipo de resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados que han contribuido a esta revisión forman parte de la labor investigadora de todos y cada uno de los componentes del laboratorio 307 del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra": Pilar Navarro, M. Victoria Amador, Bruno Dallagiovanna, Esther Lafuente, M. Jesús Chiquero, Laura Barreiro, J. María Pérez-Victoria, Carlos Robello, Sheny Arana y Cristina Torres. El trabajo está apoyado actualmente por los Proyectos: No. PB94/0051 (F. G.) y PM95/00503 (S. C.) de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, el Proyecto de Unión Europea INCO-DC (PL-950112) y el Plan Andaluz de Investigación (Código de Grupo No. 3062).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAMARRO, F. Y CASTANYS, S.: En: *Parasitología Molecular* (1993) CSIC .Nuevas Tendencias vol 24, pp 113-134, eds. L. Rivas y M. C. López, Madrid.
- (2) FERONE, R.: *J Biol Chem* (1970), **245**:850-854.
- (3) CHIQUERO, M. J., PÉREZ-VICTORIA, J. M., O'VALLE, F., GONZÁLEZ-ROS, J. M., DEL MORAL, R. G., FERRAGUT, J. A., CASTANYS, S. Y GAMARRO, F.: *Biochem Pharmacol* (sometido).
- (4) ESCRIBA, V. P., FERRER-MONTIEL, A. V., FERRAGUT J.A. Y GONZÁLEZ-ROS, J. M.: *Biochemistry* (1990), **29**:7275-7282.
- (5) GAMARRO, F., CHIQUERO, M. J., AMADOR, M. V., LÉGARÉ, D., OUELLETTE, M. Y CASTANYS, S.: *Biochem Pharmacol* (1994), **47**:1939-1947.
- (6) HIGHTOWER, R. C., RUIZ-PÉREZ, L.M., WONG, M. L. Y SANTI, D. V.: *J Biol Chem* (1988), **263**:16970-16976.
- (7) CHIQUERO, M. J., OLMO, A., NAVARRO, P., RUIZ-PÉREZ, L. M., CASTANYS, S., GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D., Y GAMARRO, F.: *Biochim Biophys Acta* (1994), **1227**:188-194.