

LAS PIROFOSFATAS DE LOS PARASITOS INTESTINALES II. INHIBICION POR AGENTES FARMACOLOGICOS

POR

Lino Holguin Vélez y *Miguel Monteoliva Hernández*
Doctor en Medicina Colaborador científico

ANTECEDENTES

En la comunicación anterior (Holguin L., Monteoliva M., 1965) revisamos el estado actual de los estudios sobre pirofosfatasas y estudia más las características enzimáticas de las pirofosfatasas de tres parásitos intestinales: *Ascaris lumbricoides*, *Ascaridia galli* y *Moniezia expansa*. Encontramos que los nematodos estudiados presentaban una actividad pirofosfatásica 10 veces superior al cestode y en ambos casos tenían un pH óptimo de acción de 6,2 en tampón maleato sódico. Salvo diferencias de orden cualitativo no se encontraron otras en la pirofosfatasa de los nematodos y la del cestode. Por otra parte, se confirmó que en estos parásitos el enzima con actividad pirofosfatásica tiene como verdadero sustrato al pirofosfato magnésico y que aparentemente hay un solo enzima con esta actividad, ya que sólo se encontró un pH óptimo y en el desarrollo electroforético sólo da una zona con actividad (Monteoliva M., 1961).

En la presente nota estudiamos la acción inhibidora que ejercen sobre este enzima diferentes agentes farmacológicos del tipo antihelmínticos, antibióticos, etc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los parásitos utilizados han sido recogidos del Matadero Municipal de Granada y tratados como se indicó en la anterior comunicación, hasta obtener extractos en solución salina al 0,2

por 100 para *Ascaris* y *Ascaridia* y al 2 por 100 para *Moniezia*. Con estos extractos se realizaron determinaciones simultáneas de la actividad pirofosfatásica a pH 6,2 en tampón maleato sódico (Colowick y Kaplan, 1955) y a cuatro concentraciones diferentes de sustrato y agente activante:

S - I =	pirofosfato sódico	$4,68 \times 10^{-4}$ M	+	Cloruro magnésico	$9,36 \times 10^{-4}$ M
S - II =	ídem	$4,68 \times 10^{-4}$ M	+	—	—
S - III =	ídem	$2,34 \times 10^{-4}$ M	+	Cloruro magnésico	$9,36 \times 10^{-4}$ M
S - IV =	ídem	$2,34 \times 10^{-4}$ M	+	—	—

El agente inhibidor se ensayó con cada sustrato de los antedichos y a dos concentraciones diferentes:

I - A =	$0,78 \times 10^{-4}$ M
I - B =	$6,25 \times 10^{-4}$ M

Para la preparación del agente inhibidor se partió de productos químicamente puros, pesados en la cantidad adecuada para la correspondiente molaridad, disueltos en agua destilada y neutralizados con ácido clorhídrico o sosa según los casos y completados con más agua destilada hasta el volumen adecuado.

La incubación se realizó como sigue: En una gradilla se colocan el suficiente número de tubos de ensayo para la experiencia dispuestos en cuatro series y en cada serie se pone 2 ml. del sustrato adecuado y 3 ml. de tampón maleato sódico de pH 6,2 (Holguin L. Monteoliva M., 1965). En el primer tubo correspondiente a cada sustrato se pone 10 ml. de agua destilada. En el segundo tubo se colocan 2 ml. de agua destilada y 8 ml. del agente inhibidor a la concentración A. En el tercer tubo, 2 ml. de agua destilada y 8 ml. del inhibidor a la concentración B. En el cuarto se colocan 2 ml. del extracto enzimático y 8 ml. de agua destilada. En el quinto tubo se colocan 2 ml. del extracto enzimático y 8 ml. de la solución A del inhibidor. Y en el sexto tubo 2 ml. del extracto y 8 ml. de la solución B del inhibidor. Las series para cada sustrato y cada inhibidor se realizaron simultáneamente, al objeto de emplear en la serie el mismo extracto de parásito.

Preparados de esta forma la gradilla con los tubos de incubación se pasaron a la estufa a 37° durante 180 minutos. Transcurrido este tiempo se llevan a agua helada y una vez enfriados se agrega a todos los tubos 1 ml. de ácido tricloroacético al 20 por 100 con agitación. Se deja reposar en agua helada y una vez

sedimente el precipitado que se forma se toma del sobrenadante 1 ml., en el que se determinan los fosfatos por el método de Briggs, modificado por Fleury (1955).

La diferencia entre el tubo cuarto y primero corresponde a la actividad enzimática del extracto en ausencia de inhibidor. La diferencia entre el tubo quinto y el segundo corresponde a la actividad enzimática en presencia del inhibidor a la concentración A, y la diferencia entre el sexto y el tercero corresponde a la actividad del extracto cuando el inhibidor está a la concentración B. Las diferencias entre los valores de actividad encontrados para el extracto en ausencia del inhibidor y para el mismo extracto en presencia del inhibidor se refieren después a porcentajes de inhibición dando valor 100 a la actividad del extracto en ausencia del inhibidor.

RESULTADOS

T A B L A 1

Porcentaje de inhibición de los diversos farmacos ensayados frente a extractos de *ascaris lumbricoides*

INHIBIDOR	S - I		S - II		S - III		S - IV	
	I - A	I - B	I - A	I - B	I - A	I - B	I - A	I - B
Piperazina	12,3	46,9	4,3	22,4	-3,3	22,2	-4,8	10,7
Yoduro de ditiazanina	3,2	19,6	6,5	37,5	5,5	24,1	13,0	44,4
Pamoato de pirvinium	5,4	39,9	15,8	46,5	12,4	18,1	-8,0	31,4
Diethylcarbamacina	9,3	80,0	27,5	76,5	6,6	40,4	6,3	75,2
Hidroxinaftoato de bephenium	5,2	22,9	3,2	44,8	0,8	12,7	0,3	64,9
Diyodohidroxiquinoleina	7,8	21,6	5,3	46,2	1,7	9,5	4,2	42,2
Bromhidrato de arecolina	5,5	27,3	2,6	40,4	5,1	23,7	4,8	42,4
Ditiocarbo-bis-etilendiamina	-5,6	15,6	-2,5	-19,0	-18,0	-45,0	2,3	-17,0
Bencilpenicilina	6,7	24,2	4,4	41,1	0,7	5,6	1,6	44,7
Sulfato de estreptomycin	5,1	27,9	7,1	44,2	8,8	31,4	2,0	45,9
Demetilclorotetraciclina	2,1	38,5	4,1	4,7	2,1	20,1	-9,3	13,9
Clorhidrato de aureomicina	8,4	-7,5	-2,8	0,0	7,1	28,1	-1,8	1,6
Oxitetraciclina	8,6	47,3	13,2	50,6	6,7	5,8	11,8	45,4
Cloranfenicol	0,2	23,3	3,5	45,9	-3,1	14,7	11,0	38,3
Estearato de eritromicina	0,2	27,5	6,1	35,8	-3,3	-46,0	6,9	44,9
Clorhidrato de tetraciclina	0,4	37,7	-7,1	-6,5	0,1	48,4	-33,0	-52,0
Metansulfonato de colistina	3,2	-0,5	5,9	40,7	3,5	16,1	-12,0	6,0
Sulfisoxazol	3,4	4,1	5,7	44,6	2,3	4,2	9,3	43,6
Sulfametoxipiridazina	4,7	25,0	30,5	55,5	-18,0	21,1	12,4	43,8
Clorambucil	0,7	16,7	-5,6	15,4	-1,7	3,5	-11,0	2,0
Busulfan	13,1	23,9	0,4	36,5	13,6	38,4	4,8	37,8

T A B L A 2

Porcentajes de inhibición de la actividad pirofosfatasa de extractos de *Ascaridia galli*

INHIBIDOR	S-I		S-II		S-III		S-IV	
	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B
Piperazina	15,9	47,7	-2,5	24,0	-8,2	30,1	-8,6	6,9
Yoduro de ditiazanina	-0,2	7,1	-3,5	4,7	4,5	-0,1	-1,5	-10,0
Pamoato de pirvinium	0,8	18,6	7,9	40,3	4,2	-7,9	2,2	29,6
Dietilcarbamacina	24,8	91,1	20,6	69,6	5,6	48,2	24,7	41,4
Hidroxinaftoato de bethovenium	2,0	15,4	-1,0	38,0	0,8	11,5	34,0	72,9
Diyodohidroquinoleina	1,3	3,4	3,5	44,5	1,5	4,6	2,2	42,0
Bromhidrato de arecolina . . .	3,4	22,4	2,2	40,5	2,9	15,3	1,9	39,1
Ditiocarbo-bis-etilendiamina .	-22,0	2,4	-6,6	-23,0	-29,0	-55,0	-2,7	-7,4
Bencil-penicilina	0,8	18,7	-2,0	32,5	-5,5	-2,0	2,6	24,6
Sulfato de estreptomycin . . .	5,7	26,4	2,7	43,4	-1,1	22,8	1,9	35,5
Demetilclorotetraciclina . . .	0,7	38,2	-2,0	5,5	-1,1	-0,5	-5,2	22,3
Clorhidrato de aureomicina . .	-4,0	35,9	-1,5	-10,0	7,5	51,4	-2,2	5,3
Oxitetraciclina	6,9	48,5	11,3	46,1	6,1	23,4	7,9	32,8
Cloranfenicol	0,9	16,8	3,8	35,3	0,9	1,2	-0,7	32,1
Estearato de eritromicina . . .	7,3	30,8	-0,3	34,9	-8,4	-50,0	2,9	37,9
Clorhidrato de tetraciclina . .	8,6	62,7	-4,7	19,8	9,4	57,5	4,5	29,0
Metansulfonato de colimicina .	-0,4	9,4	2,2	40,7	1,5	20,4	4,3	38,2
Sulfisoxazol	4,1	-6,4	6,1	42,5	-0,9	-7,5	8,6	43,3
Sulfametoxipiridazina	2,1	20,0	31,0	45,7	-23,0	13,1	3,2	39,1
Clorambucil	1,0	12,2	-7,4	15,5	2,1	8,9	-9,2	2,1
Busulfan	11,8	22,1	0,4	35,6	-0,6	21,6	-14,0	28,3

T A B L A 3

Porcentajes de inhibición de la actividad pirofosfatasa de extractos de *Moniezia expansa*

INHIBIDOR	S-I		S-II		S-III		S-IV	
	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B
Piperazina	4,9	17,7	-7,0	8,4	0,2	20,8	-7,3	-2,1
Yoduro de ditiazanina	-4,0	11,0	-8,7	-4,0	2,7	5,4	-13,0	-6,9
Pamoato de pirvinium	11,9	26,6	7,6	50,0	-8,6	14,8	-11,0	31,7
Dietilcarbamacina	27,8	92,7	13,5	12,9	16,7	78,6	17,7	56,8
Hidroxinaftoato de bethovenium	-4,0	4,3	0,9	19,5	-2,8	0,4	3,2	10,9
Diyodohidroquinoleina	-0,9	0,1	1,7	18,4	2,8	20,9	2,5	28,2
Bromhidrato de arecolina . . .	2,7	21,5	1,5	26,5	-2,5	11,7	1,7	25,2
Ditiocarbo-bis-etilendiamina .	7,3	17,1	-22,0	-27,0	-16,0	-34,0	-10,0	-17,0
Bencil-penicilina	0,0	16,2	1,1	20,7	0,7	3,1	-7,2	16,3
Sulfato de estreptomycin . . .	5,8	15,8	5,2	44,4	2,2	20,6	12,2	34,9
Demetilclorotetraciclina . . .	0,7	41,4	-3,3	8,7	-2,2	22,6	-4,4	19,7
Clorhidrato de aureomicina . .	-4,7	20,8	2,7	7,2	1,8	36,9	0,5	3,0
Oxitetraciclina	2,3	34,5	-2,5	-2,7	-2,8	-12,0	8,2	27,4
Cloranfenicol	0,7	19,4	-0,4	48,4	0,6	13,8	2,8	37,2
Estearato de eritromicina . . .	-3,6	26,7	4,0	37,6	-14,0	-52,0	2,1	35,6
Clorhidrato de tetraciclina . .	5,9	42,9	0,5	2,3	1,9	43,0	-18,0	-40,0
Metansulfonato de colimicina .	6,8	40,1	4,6	40,0	6,0	42,4	1,4	24,0
Sulfisoxazol	-2,6	-5,0	-0,6	19,6	0,5	2,0	-8,5	7,0
Sulfametoxipiridazina	4,0	19,6	-1,6	-2,3	7,4	47,6	1,1	24,7
Clorambucil	6,4	11,9	-7,2	9,2	-2,3	6,0	-7,9	0,2
Busulfan	4,0	10,2	2,7	32,4	0,7	21,3	3,8	16,1

T A B L A 4

Media de los porcentajes de inhibición de los tres parásitos estudiados y por grupos de medicamentos

INHIBIDOR	S-I		S-II		S-III		S-IV	
	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B	I-A	I-B
Con azufre reducido:								
Yoduro de ditiazanina	-0,3	12,5	-1,9	12,7	4,2	9,8	0,5	9,1
Ditiocarbo-bis-etilendiamina .	-6,7	11,7	-10,3	-23,0	-21,0	-44,6	-3,4	-13,8
Bencil-penicilina	2,5	19,7	1,1	31,4	-1,3	2,2	-1,0	28,5
Media	-1,5	14,6	-3,7	7,0	-6,0	-10,8	-3,2	7,9
Con azufre oxidado:								
Cloranfenicol	0,6	19,8	2,3	43,2	-0,5	9,9	4,3	35,8
Sulfisoxazol	1,6	-2,4	3,7	35,5	0,6	-1,0	3,1	26,6
Sulfametoxipiridazina	3,6	21,5	19,9	32,9	-11,2	27,2	5,5	35,8
Busulfan	9,6	18,7	1,1	34,8	5,2	27,1	-1,8	27,4
Media	3,8	14,4	6,7	36,6	-1,4	15,8	2,7	31,4
Grupo tetraciclinas:								
Demetilclorotetraciclina . . .	1,1	39,3	-0,4	6,3	-0,4	14,0	-6,3	18,6
Clorhidrato de aureomicina . .	-0,1	16,4	-0,5	-0,9	5,4	38,8	-1,1	3,3
Oxitetraciclina	5,9	43,4	7,3	31,3	3,3	5,7	9,3	35,2
Clorhidrato de tetraciclina . .	4,9	47,7	-3,7	5,2	3,8	49,6	-15,5	-21,0
Media	2,0	36,7	0,6	10,4	3,0	27,0	-3,4	9,0
Antibióticos azucarados:								
Sulfato de estreptomycin . . .	5,5	23,3	5,0	44,0	3,3	24,9	5,3	38,7
Estearato de eritromicina . . .	1,3	28,3	3,2	36,1	-8,5	-49,3	3,9	39,4
Media	3,4	25,8	4,1	40,0	-2,6	-12,2	4,6	39,0
Antibióticos polipeptídicos:								
Metansulfonato de colimicina . .	3,2	16,3	4,2	40,4	3,6	26,3	-2,1	22,7
Media	3,2	16,3	4,2	40,4	3,6	26,3	-2,1	22,7
Otros:								
Piperazina	11,0	37,4	-1,7	18,2	-3,7	24,3	-6,9	4,9
Dietilcarbamacina	20,6	87,9	20,5	53,0	9,6	55,7	16,2	57,8
Pamoato de pirvinium	6,0	35,1	10,4	18,2	2,6	24,3	-5,6	4,9
Hidroxinaftoato de bethovenium	1,0	14,2	1,7	34,1	-0,4	8,2	8,2	49,5
Diyodohidroquinoleina	2,7	8,3	3,5	36,3	2,0	11,6	2,9	37,4
Bromhidrato de arecolina . . .	3,8	23,7	2,1	35,8	1,8	16,9	2,8	35,9
Clorambucil	2,7	13,6	-6,7	13,3	-0,6	6,1	-9,3	1,4
Media	6,8	26,1	4,2	29,8	1,6	21,0	1,1	27,4

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En general, un agente antimetabólico puede actuar sobre un proceso metabólico normal, catalizado por un enzima, por diferentes vías: Una de ellas reaccionando químicamente con el en-

zima y anulando su actividad, proceso que puede ser reversible o irreversible según la naturaleza de la reacción química que se produzca entre enzima e inhibidor. Pero el proceso se complica si se tiene en cuenta que en la reacción enzimática interviene también el sustrato, el cual para poderse transformar ha de reaccionar con el enzima. Esta reacción enzima-sustrato es reversible y esta reversibilidad está condicionada por la presencia del inhibidor. El cual puede actuar impidiendo la formación del complejo enzima-sustrato, bien a través del sustrato, bien a través del enzima. Más complicado es el proceso si se tiene en cuenta que, como en nuestro caso, interviene un cuarto factor: el activador. En este caso el inhibidor puede bloquear la reacción enzimática, bien a través del sustrato, bien a través del enzima, o bien a través del activador. Así, si queremos averiguar el modo de acción del fármaco inhibidor han de multiplicarse los ensayos variando las concentraciones de los elementos que entran en juego.

Por ello se montó una marcha sistemática, en la que utilizando siempre la misma concentración de enzima, se variaron las concentraciones de pirofosfato, de magnesio y de inhibidor, respetando las demás circunstancias óptimas, es decir incubación a pH 6,2, en tampón maleato, a 37° y durante 180 minutos.

Se tiene de esta forma cuatro sustratos diferentes. El S-I, en el cual la relación molar entre pirofosfato y magnesio es la óptima para la acción del enzima y es precisamente en el que se obtienen mayores actividades en ausencia del inhibidor. Un sustrato S-II, en el que sólo existe pirofosfato a la misma concentración que el S-I y ausente el magnesio. Un sustrato S-III, en el que la molaridad del pirofosfato es mitad de las anteriores, dejando el magnesio a la molaridad de S-I, con lo que la relación de molaridad óptima está desequilibrada a favor del activador. Y un sustrato S-IV, en el que está ausente el activador y el pirofosfato está a mitad de molaridad en relación al S-I y S-II.

Ya en ausencia del inhibidor, las actividades de los extractos son diferentes según el sustrato. Si se hace la actividad del S-I igual a 100, la correspondiente a los restantes es como sigue:

S - I	=	100
S - II	=	45
S - III	=	57
S - IV	=	42

Se ensayaron 21 fármacos de composición química diferente, entre los cuales hay 8 antiparasitarios, 9 antibióticos, 2 quimioterápicos y 2 citostáticos. Los resultados obtenidos, con expresión de los porcentajes de inhibición en los tres parásitos estudiados, se exponen en las tablas n.º 1, 2 y 3.

Como puede observarse en estas tablas, junto a resultados positivos de inhibición (hasta el 92,7 por 100 en el caso de la dietilcarbamacina) se encuentran resultados negativos, lo que indica que en determinadas circunstancias se produce una activación de la reacción enzimática. La mayor frecuencia de los casos de activación se producen en los sustratos S-I, S-III y S-IV a la concentración más baja. En general, se puede explicar este fenómeno suponiendo que el inhibidor a baja concentración actúa restableciendo en parte el equilibrio óptimo entre el pirofosfato y magnesio, aumentando por consiguiente la actividad del extracto.

Al objeto de acumular datos, y puesto que no se han encontrado diferencias de orden cualitativo entre las pirofosfatasas de los tres parásitos estudiados, sino de orden cuantitativo, compensadas en la preparación de los extractos, se ha obtenido la media de los porcentajes de cada parásito, media que se expresa en la tabla n.º 4. En esta tabla, además, se han ordenado los fármacos inhibidores de acuerdo con lo que a priori, podría suponerse fuesen sus grupos funcionales condicionantes de su actividad.

Se obtiene así un primer grupo que presenta en su molécula azufre al estado reducido, en el que el porcentaje de resultados de activación (inhibición negativa) es del 75 por 100 para baja concentración del inhibidor y del 25 por 100 para concentración elevada del inhibidor. Estos resultados son justificables si se tiene en cuenta que las pirofosfatasas son enzimas con grupo activo -SH necesario para su actividad. Los fármacos de este primer grupo actuarían sobre el enzima estabilizando este grupo funcional. Este proceso es muy claro con ditiocarbabis-etilendiamina.

En el segundo grupo se han incluido aquellas sustancias que presentan en su molécula el azufre al estado oxidado (-SO₂). Se incluye también el cloranfenicol asimilando el NO₂ al SO₂. Aquí los resultados de inhibición negativa son menos que en el grupo anterior y puede observarse que en general la inhibición en sus-

tratos con sólo pirofosfato es doble que cuando existe magnesio. Puede explicarse por una acción competitiva entre el pirofosfato (P_2O_7) y el SO_2 hacia la zona de unión con el enzima y que no está contrarrestada por el magnesio, que está ausente.

El tercer grupo es bastante homogéneo químicamente, puesto que son de la serie de las tetraciclinas. Los resultados son relativamente homogéneos y puede observarse en la tabla que la inhibición es mayor en los sustratos donde hay magnesio. Puede justificarse, pues, la acción de estos inhibidores por bloquear el agente activante con disminución consiguiente de la actividad enzimática.

En el grupo de los antibióticos azucarados se manifiesta el mismo fenómeno que en el segundo grupo, es decir, la inhibición es mayor en ausencia de magnesio, pero aquí es difícil dar una explicación del proceso.

En el grupo de antibióticos polipeptídicos el proceso es semejante al anterior y sin que tampoco pueda darse una explicación de su forma de acción.

El grupo restante está constituido por una serie heterogénea de sustancias orgánicas, cuyo único elemento común es el nitrógeno, pero que puede estar como nitrógeno amínico o aromático, por lo que los resultados son bastante heterogéneos. En este grupo destaca la dietilcarbamacina, que presenta una inhibición elevada en todos los sustratos e incluso a baja concentración del inhibidor. Esto parece indicar que este fármaco actúa directamente sobre el enzima por bloqueo directo de sus grupos activos.

El orden de mayor a menor inhibición, teniendo en cuenta solamente el sustrato S-I, en el que se encuentran equilibrados el pirofosfato y el magnesio y que da una actividad óptima para el enzima, es como sigue: (sólo se tiene en cuenta la concentración $6,25 \times 10^{-4}$ del inhibidor).

TABLA 5
Porcentaje de inhibición de las pirofosfatasa de los parásitos intestinales por diversos fármacos para una concentración molar de pirofosfato = $4,68 \times 10^{-4}$
magnesio = $9,36 \times 10^{-4}$
inhibido = $6,25 \times 10^{-4}$

Núm.	Inhibidor	% de inhibición
1	Dietilcarbamacina	87,9
2	Clorhidrato de tetraciclina	47,7
3	Oxitetraciclina.	43,4
4	Demetilclorotetraciclina	39,3
5	Piperazina	37,4
6	Pamoato de pirvinium	35,1
7	Estearato de eritromicina.	28,3
8	Bromhidrato de arecolina.	23,7
9	Sulfato de estreptomicina.	23,3
10	Sulfametoxipiridazina	21,5
11	Cloranfenicol	19,8
12	Bencil-penicilina	19,7
13	Busulfan	18,7
14	Clorhidrato de aureomicina	16,4
15	Metansulfonato de colimicina	16,3
16	Hidroxinaftoato de bephenium.	14,2
17	Clorambucil.	13,6
18	Yoduro de ditiazanina	12,5
19	Ditiocarbo-bis-etilendiamina	11,7
20	Diyodohidroxiquinoleina	8,3
21	Sulfisoxazol.	2,4

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado la acción inhibitoria que sobre las pirofosfatasa de los parásitos intestinales ejercen diferentes fármacos utilizados como antihelmínticos, antibióticos, quimioterápicos, etc. Los que sobrepasan el 30 por 100 de inhibición son dietilcarbamacina, clorhidrato de tetraciclina, oxitetraciclina, demetilclorotetraciclina, piperazina y pamoato de pirvinium. Hay otros, como ditiocarbobis-etilendiamina, que aparentemente actúa más bien como activador que como inhibidor.

S U M M A R Y

A study has been made of the inhibiting action with different drugs such antihelmintics, antibiotics, chemotherapics, etc. have on intestinal parasite pyrophosphatases.

Those which exceed 30 % inhibition are diethylcarbomacine, hydroxy-tetracycline, oxytetracycline, demethylchlorotetracycline, piperazine and pyrvinium pamoate. Apparently dithiocarbo-bis-ethylenediamine acts more as an activator than as an inhibitor.

BIBLIOGRAFIA

- COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. (1955).—Methods in Enzymology. Tomo I. Academic Press. Nueva York.
- FLEURY, P. (1955).—Fiches techniques de chimie biologique. Ed. Vega, Paris.
- HOLGUIN, L., MONTEOLIVA, M. (1965).—REV. IB. PARASITOL., 25; 101.
- MONTEOLIVA, M. (1961).—REV. IB. PARASITOL., 21; 339.