

ACTIVIDAD ARGINASICA Y VARIACIONES CUANTITATIVAS DE LAS PROTEINAS Y DEL PESO DURANTE LA EMBRIOGENESIS DEL SAPO *BUFO SPINOLOSUS*.

Arginase activity, amount of proteins and body weight during the embryogenesis of the toad *Bufo spinolosus*.

MARTA BRETOS, CARLOS MARTÍNEZ y JULIO CABELLO

Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Borgoño 1470, Santiago, Chile.

Recibido para su publicación el 10 de Enero de 1967.

RESUMEN

Se han estudiado las modificaciones que experimentan el peso, la cantidad de proteínas y la actividad arginásica durante la embriogénesis del sapo.

Las variaciones que se observan en el peso húmedo de los embriones de *Bufo spinolosus* son debidas principalmente a la pérdida e incorporación de agua al medio ambiente.

La cantidad de proteínas totales aumenta en las 3 primeras horas, alcanzando un nivel que se mantiene constante hasta las 45 horas, es decir, no muestra variaciones durante la segmentación y la blastulación. Desde las 45 a las 75 horas experimenta una elevación debida a una activa síntesis proteica, y desde las 75 a las 100 horas se produce un descenso. Estas variaciones obedecen a cambios que experimentan las proteínas del sedimento, ya que las proteínas de la fracción sobrenadante se mantienen casi constantes. En esta última fracción se encuentra la arginasa.

La actividad arginásica presenta un nivel bajo en el huevo sin fecundar y luego desciende hasta llegar a un mínimo en la blastulación. A partir de las 45 horas (gastrulación) se observa un aumento que se mantiene hasta que los embriones comienzan a eclosionar. En las larvas se produce una disminución de la actividad de esta enzima. Es posible que estas modificaciones de la actividad arginásica estén vinculadas no sólo con la eliminación de nitrógeno, ya que gran parte de él se excreta en forma de amoníaco, sino también con importantes procesos biosintéticos de la morfogénesis. Apoyarían este planteamiento las relaciones que se han demostrado entre las reacciones del ciclo de la urea y la biosíntesis de proteínas, especialmente básicas, y de nucleótidos purínicos y pirimidínicos.

INTRODUCCIÓN

Los animales deben encarar un problema importante, íntimamente ligado a la cantidad de agua que les ofrece el medio ambiente, la eliminación de los residuos nitrogenados provenientes del metabolismo de los aminoácidos y de los nucleótidos. Los vertebrados solucionan este problema utilizando varios productos de excreción de estos residuos. Entre los principales figuran: el amoníaco (peces Acti-

nopterigios) (vertebrados amoniotéticos), el ácido úrico (aves y reptiles, exceptuando algunas tortugas) (vertebrados uricotéticos) y la urea (1, 2). La eliminación del nitrógeno fundamentalmente por medio del ciclo de la ornitina (Fig. 1) se lleva a cabo en los siguientes grupos: elasmobranquios, coanictios (dipnoos), anfibios (anuros y urodelos), algunos anápsidos (reptiles quelónidos) y los mamíferos. Son ellos los vertebrados ureotéticos (2, 3, 4, 5, 6).

CONEXIONES METABOLICAS DEL CICLO UROGENETICO

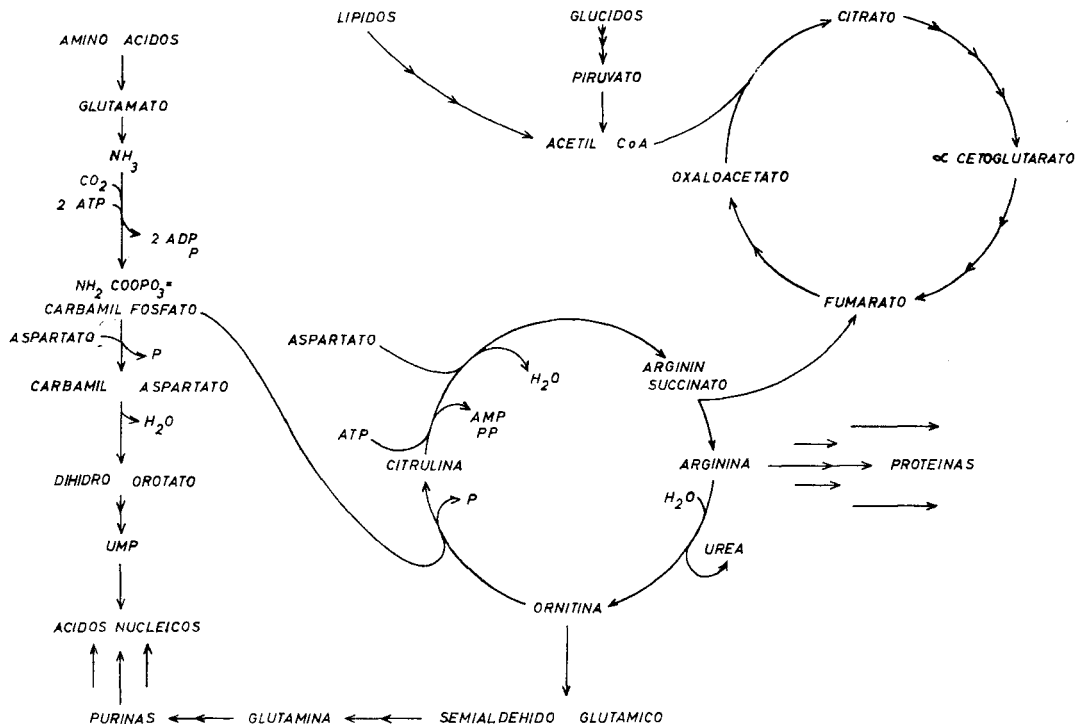


Fig. 1: Esquema que representa las reacciones del ciclo ureogénético y sus relaciones metabólicas.

El ciclo de la ureogénesis tiene múltiples relaciones metabólicas (Fig. 1) que conviene tener presentes al analizar este ciclo en organismos en formación.

Se ha estudiado el ciclo de la ornitina durante el desarrollo de algunos tetrápodos, observándose en mamíferos que la urea no se sintetiza en una proporción significativa en el hígado sino hasta fines de la época fetal. En el período embrionario de la rata y el cerdo se han encontrado niveles significativos de algunas enzimas del ciclo ureogénico: ornitina-transcarbamilasa y arginasa (7, 8). En anuros se ha observado que las larvas precoces son fundamentalmente amoniotélicas y a medida que avanza la metamorfosis aumenta la excreción de urea y disminuye la de amoníaco. Posteriormente, al producirse la adaptación a la vida terrestre, hay una marcada elevación de la actividad de las enzimas del ciclo de la ornitina, lo que da a entender que este ciclo sería inducido en ese momento (5). Durante el desarrollo embrionario de otros anuros se han identificado pequeñas can-

tidades de urea en el medio de cultivo de los embriones durante la segmentación, aumenta en los últimos períodos del desarrollo embrionario y descende hacia la eclosión. Se han encontrado, además, en el medio de cultivo, cantidades crecientes de amoníaco en niveles bastante superiores a los de la urea (9). En urodolos se ha comprobado alguna actividad arginásica durante la gastrulación, después de la cual esta actividad se incrementa hasta antes de la eclosión (10). Los autores de este último trabajo creen que el ciclo de la ornitina comienza a operar desde el estado de néurula.

Entre las enzimas de este ciclo, una de las más estudiadas ha sido la arginasa (L-arginina urea hidrolasa E.C. 3.5.3.1), que cataliza la transformación de la arginina en ornitina y urea (8, 11, 12, 13, 14, 15). La arginasa está presente no sólo en el hígado sino también en otros tejidos.

Considerando: a) que la condición ureotélica definitiva en anuros se establece al final de la metamorfosis y b) que a pesar de esto último no se puede excluir

la posibilidad de que funcione completa o parcialmente el ciclo de la ornitina en la embriogénesis de los anuros, se ha estimado interesante estudiar la actividad de la arginasa durante las primeras etapas del desarrollo del sapo *Bufo spinolosus* y relacionarla con otros aspectos que se observan en las mismas etapas.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de los huevos y embriones. Se usaron ejemplares de *Bufo spinolosus* Wiegmann, 1834, que provenían de las siguientes localidades de la provincia de Santiago: Tilt-Til, El Arrayán y Peñalolén. Los distintos estados del desarrollo embrionario se obtuvieron empleando los métodos descritos para anuros por Hamburger (16) y Valencia (17).

Se tomaron hembras adultas recientemente recolectadas y se les indujo la ovulación inyectándoles hipófisis enteras de hembras de la misma especie, suspendidas en solución Holtfreter al 10%, en la cavidad peritoneal. El número de glándulas inyectadas a cada hembra fluctuó entre 3 y 7, de acuerdo con la estación del año, para lo cual se usó como guía la tabla de Valencia para *Bufo spinolosus* (17).

Los machos producen espermios funcionales todo el año, por lo cual no se les administró hipófisis (17). Los huevos obtenidos se colocaron en una suspensión de espermios fresca, preparada de la siguiente manera: se extrajeron los testículos a uno o dos machos adultos y se desmenuzaron con tijeras finas en solución Holtfreter al 20%, utilizando 10 ml por cada par de testículos. Antes de colocar esta suspensión con los huevos se comprobó el movimiento de los espermios al microscopio. Los gametos se mantuvieron en contacto durante media hora.

Se verificó la fecundación observando al microscopio el levantamiento de la membrana de fecundación y el giro de los huevos, que antes de este proceso se encontraban con el polo vegetativo, más pesado y más claro, hacia arriba. Luego se lavaron los huevos y se dejaron en solución Holtfreter al 10%, donde permanecieron durante toda la embriogénesis. El medio se renovó una vez al día y se extrajeron de él los huevos citolizados y los embriones muertos.

El tiempo de desarrollo se comenzó a medir desde el momento en que los gametos se pusieron en contacto. Los estados usados para las mediciones se clasificaron atendiendo al aspecto y estructuras que se observaron al microscopio (Fig. 2), de acuerdo con la tabla de desarrollo normal hecha por Valencia (17) para *Bufo spinolosus*. Para cada una de las mediciones se tomó un promedio de 100 huevos o embriones.

Técnica del pesaje. Los huevos están envueltos por cubiertas gelatinosas: una capa doble concéntrica en cada huevo y un cilindro de doble pared dentro del cual van todos ellos (17). Para hacer las determinaciones se colocaron los huevos o embriones en un vi-

drio de reloj y se les extrajeron mecánicamente las envolturas de gelatina. Luego se pesaron en una balanza de precisión (peso húmedo).

Antes de la neurulación (hasta las 47 horas de desarrollo aproximadamente) es muy difícil extraer las envolturas gelatinosas en su totalidad por medios mecánicos. Debido a esto fue preciso rectificar los pesos húmedos de las etapas precoces del desarrollo embrionario usando un factor de corrección que se obtuvo al digerir estas envolturas con papaína. Para ello se siguió la técnica descrita por Spiegel (18) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de papaína (Harma Drug, Francia) al 5% en Holtfreter al 10%, se le agregaron 120 mg de clorhidrato de cisteína a 100 ml de esta solución y se ajustó el pH a 6,7. Los huevos o embriones precoces se expusieron a esta solución agitando continuamente. Se examinaron al microscopio periódicamente para comprobar si quedaban restos de gelatina. Así se estableció que 90 minutos era el tiempo adecuado para la acción completa de la papaína. Los huevos o embriones sometidos a este proceso se lavaron en Holtfreter al 10% y se pesaron. Comparando estos valores con aquellos obtenidos por desgelatinización mecánica se calculó un factor de corrección que se aplicó a los resultados del pesaje.

Determinación de la actividad arginásica. Los huevos o embriones que se tomaron para las determinaciones de arginasa y proteínas se homogeneizaron en suero fisiológico y los homogeneizados se centrifugaron a 3000 RPM durante 15 minutos.

La actividad arginásica se determinó según el método descrito por Cruz-Coke, Cabello, Jadresic y Prajoux (11) modificado (14) y adaptado al material en que se realizó este experimento. Después de la activación e incubación, se dejaron reposar las muestras durante 15 minutos y luego se filtraron dos o tres veces, hasta obtener un líquido totalmente transparente. En seguida se determinó la cantidad de urea producida empleando el método colorimétrico de Archibald (19).

Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que produce un micromol de urea por minuto en las condiciones experimentales ya indicadas. La actividad específica se define como unidades de enzima por miligramo de proteína. No se hizo corrección para las unidades de arginasa porque las envolturas gelatinosas no poseen actividad arginásica.

Determinación de la cantidad de proteínas. Se realizó la determinación de proteínas según el método de Lowry modificado (20).

La centrifugación de los homogeneizados dio origen a dos fracciones en las cuales se determinó el contenido de proteínas separadamente. Debido a que el sedimento contenía casi todo el pigmento y éste dificultaba la lectura en el colorímetro, se colocaron siempre blancos de pigmento para corregir las lecturas obtenidas. La reacción se leyó en 660 milimicrones, usando una solución de se-roalbúmina de buey cristalina (0,2 mg/ml)

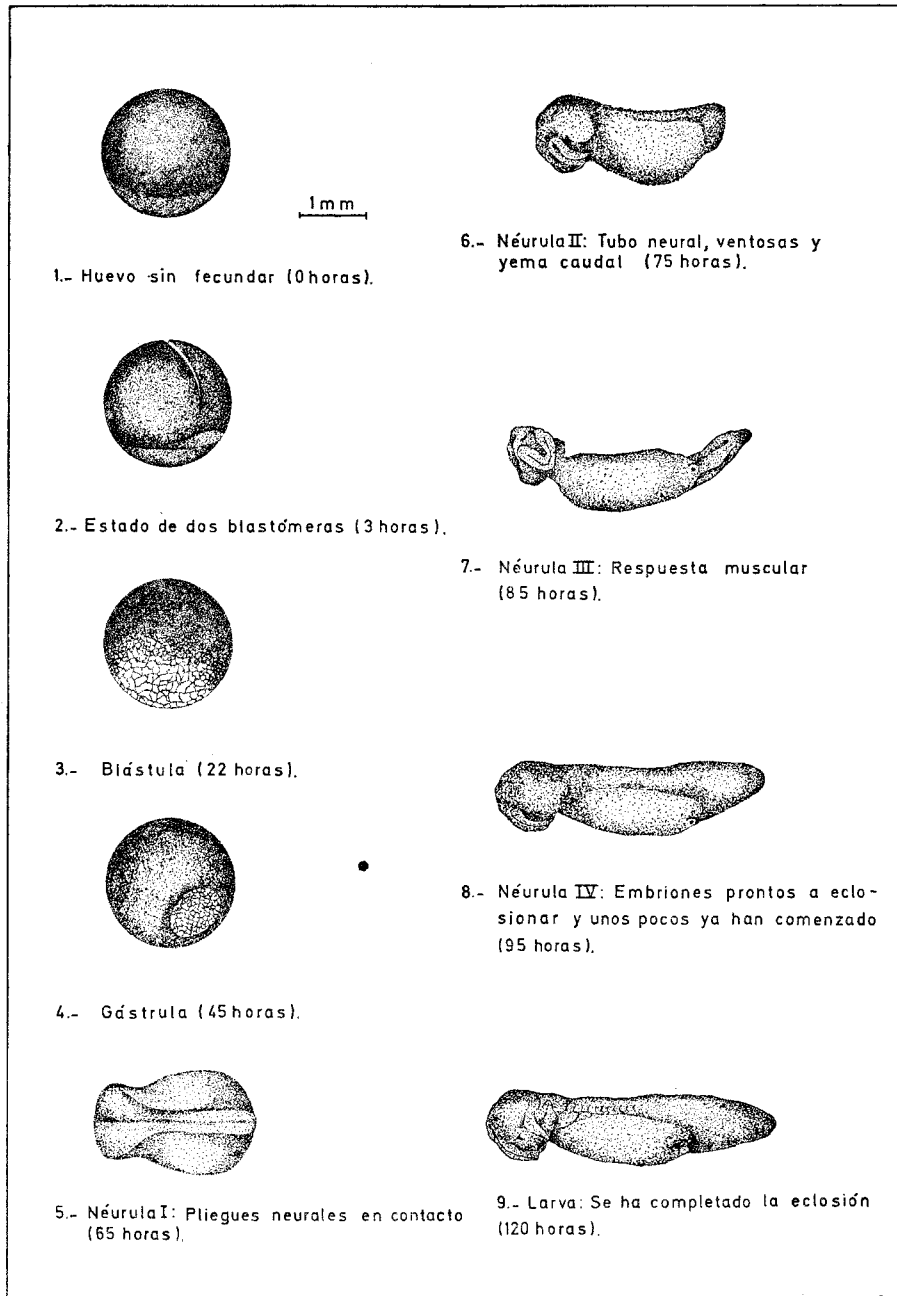


Fig. 2: Principales estados del desarrollo embrionario de "Bufo spinulosus" que se han examinado. Las horas corresponden al desarrollo a 18°C.

como patrón de proteínas en cada oportunidad en que se hizo la reacción. Se midió el contenido de proteínas de las envolturas de gelatina y se corrigieron los valores protei-

cos en los estados del desarrollo anteriores a la neurulación, de acuerdo con el factor de corrección obtenido para el peso.

RESULTADOS

Peso. Desde el huevo sin fecundar hasta el estado de dos blastómeras se observa un pequeño incremento del peso (Fig. 3), el cual se estabiliza durante la segmentación. En la gástrula y en el período en que aparecen los pliegues neurales y se ponen en contacto, la curva del peso se eleva hasta valores máximos. Luego se produce un descenso considerable, relacionado con el cierre del intestino y la reducción de la cavidad interna del embrión. A partir de las 75 horas de desarrollo hay cierto crecimiento del animal por alargamiento y el peso aumenta otra vez. Por último, disminuye algo inmediatamente después de la eclosión.

Arginasa. Al centrifugar los homogeneizados de huevos y embriones se obtuvieron dos fracciones: un sedimento y un sobrenadante. La arginasa fue encontrada sólo en el sobrenadante.

Las variaciones de esta enzima durante el desarrollo se observan en la Fig. 4. Las unidades de arginasa por embrión presentan un nivel relativamente bajo en el huevo sin fecundar y disminuyen en las primeras etapas de la segmentación, llegando a un mínimo en la blástula. A partir de la gastrulación (45 horas) se observa un ascenso que continúa en las néurulas y alcanza su máximo al finalizar la neurulación. En la larva la actividad arginásica desciende a menos de la mitad del valor máximo a que llegó durante el período embrionario.

Se creyó de interés agregar en la Fig. 4 las variaciones que experimentan las proteínas del sobrenadante, que es la

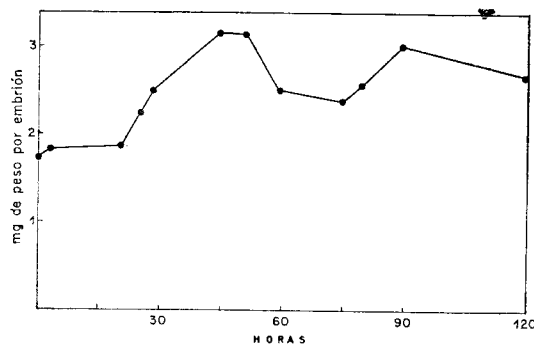


Fig. 3: Variaciones del peso húmedo durante el desarrollo embrionario del sapo "Bufo spinulosus", desde el huevo sin fecundar (0 horas) hasta la larva recién eclosionada (120 horas).

fracción que posee actividad arginásica. **Proteínas.** La cantidad de proteínas totales por embrión experimenta un incremento durante las primeras fases del desarrollo (Fig. 5). No obstante, el aumento más notable de las proteínas comienza a manifestarse a partir de las 45 horas, llegando a su máximo cuando se completa el cierre del tubo neural y hacen su aparición la región branquial y la yema caudal. En esta época se está completando la regionalización del animal, es decir, la diferenciación del cuerpo en zonas: cabeza, cuello, tronco y cola. Posteriormente se produce un descenso en las proteínas totales y se estabilizan durante la eclosión.

Era importante conocer las variaciones que experimentaban las proteínas de las dos fracciones obtenidas por medio de la centrifugación en forma separada, por cuanto sólo una de ellas presentaba actividad arginásica, como ya se ha señalado. Por ello, en la Fig. 5 se han representado además las curvas de las proteínas de ambas fracciones. Se puede apreciar que son las proteínas del sedimento las que presentaban fluctuaciones notables, en tanto que la parte proteica del sobrenadante se mantiene prácticamente constante a través de la embriogénesis del sapo.

DISCUSIÓN

Durante la embriogénesis, los anuros no utilizan del medio externo sino agua, oxígeno y sales minerales y eliminan a él anhídrido carbónico y sustancias muy difusibles, tales como amoníaco y urea (21). Desde el punto de vista del aporte de energía, el embrión es un sistema cerrado y por ello debe satisfacer los requerimientos energéticos de su mantención y desarrollo con sus reservas de vitelo. Al iniciarse el período larval se produce una serie de cambios metabólicos y hormonales, como adaptación a un nuevo estado en el cual el individuo comienza a alimentarse. La hidratación es uno de los fenómenos característicos del crecimiento embrionario (22) y tiene su expresión en el peso húmedo. El aumento de peso que se observa en los embriones de *B. spinulosus* (Fig. 3) se debería esencialmente a la incorporación de agua. El descenso que se observa entre las 55 y 75 horas sería debido a la reducción de la cavidad interna del embrión y a la eli-

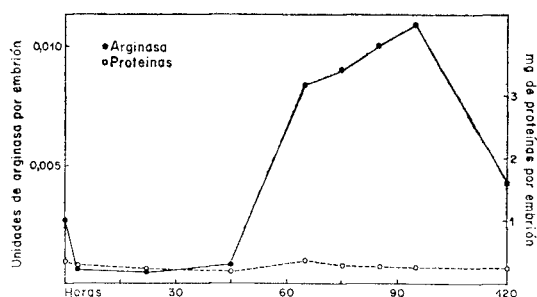


Fig. 4: Variaciones de la actividad arginásica (●—●) en el sobrenadante de homogeneizados de huevos y embriones de "Bufo spinulosus" y cantidad de proteínas (o - - - o) en el mismo sobrenadante, durante el desarrollo embrionario.

minación de gran cantidad de agua, tal como se ha señalado para otros anfibios (22).

Además de los intercambios de agua con el medio ambiente, la embriogénesis de los anfibios es un período en el cual se producen cambios metabólicos importantes, como las variaciones que se observan en las proteínas (Fig. 5), en la actividad arginásica (Fig. 4) y en los ácidos nucleicos (23, 24, 25, 26, 27, 28).

Los principales cambios cuantitativos de las proteínas totales de *B. spinulosus* encontrados en el presente trabajo ocurren en el transcurso de: a) las 3 primeras horas, b) las 45 a 75 horas y c) las 75 a 100 horas.

a) En este período se observan una serie de cambios morfofuncionales en relación con la fecundación: la penetración del espermio, modificaciones del citoplasma cortical y levantamiento de la membrana vitelina, además de la rotación del

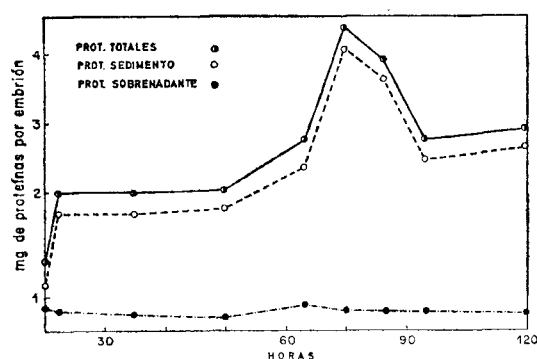


Fig. 5: Cantidad de proteínas durante la embriogénesis de *Bufo spinulosus*. - - - - - proteínas del sobrenadante; - - - proteínas del sedimento; — proteínas de ambas fracciones sumadas (proteínas totales).

huevo. Contemporáneo con estos fenómenos es el aumento cuantitativo de las proteínas, lo que no significa necesariamente que sea su consecuencia. Por otra parte, la curva alcanza un nivel que se mantiene constante durante la segmentación y la blastulación.

b) Una nueva elevación de esta curva comienza a producirse en la gastrulación y culmina durante la neurulación (45 a 75 horas). En otros anfibios se ha observado, en este período, activa síntesis proteica (23), especialmente de ribonucleoproteínas y de proteínas contráctiles, que proporcionan elasticidad a las células que deben moldear las estructuras axiales más primitivas que constituyen los rasgos fundamentales del *Phylum Chordata*. En la embriogénesis de *B. vulgaris* se ha encontrado aumento de la actividad de algunas enzimas proteolíticas (21). Este fenómeno podría tener relación con la síntesis proteica que se ha observado en este período en este trabajo, pues dichas enzimas participan en la hidrólisis de las proteínas del vitelo, contribuyendo así a la mantención del "pool" de aminoácidos del embrión (21, 23). Como se sabe, el vitelo contiene una alta concentración de fosfoproteínas, que proporcionan materias primas para la síntesis proteica (29).

c) A partir de las 75 horas, el nivel de las proteínas totales decae notablemente (Fig. 5). Esta declinación podría estar relacionada con la disminución de las reservas de vitelo que ocurre a fines de la neurulación (alrededor de las 90 horas), lo que provocaría un retardo en los procesos de síntesis y crecimiento (21). Además se ha encontrado una disminución del nitrógeno total del embrión y un aumento del amoníaco excretado al medio de cultivo en las etapas finales de la embriogénesis de *B. vulgaris* (9). Esta disminución del nitrógeno se debería, en parte, a la salida de enzimas que hidrolizan las envolturas del embrión durante la eclosión. Probablemente, la disminución del nivel de proteínas totales que hemos observado en este período esté en relación con otros cambios metabólicos que no son aún bien conocidos.

No sólo se han observado cambios cuantitativos en las proteínas embrionarias, sino también cualitativos. Las variaciones más notorias de la actividad arginásica se encuentran en los mismos tres pe-

riodos que en el caso de las proteínas (Fig. 4). Estos cambios en la arginasa concuerdan en primer lugar con una creciente eliminación de urea al medio de cultivo, observada durante la embriogénesis de *B. vulgaris*, alcanzando un máximo cerca del final de la neurulación y declinando hacia la eclosión (9); esta excreción de urea al medio de cultivo sugiere la aparición de otras enzimas del ciclo de la ornitina, además de la arginasa, durante el desarrollo embrionario. Los cambios de la arginasa concuerdan también con el hallazgo de una cierta actividad arginásica a partir de la gastrulación que aumenta hacia el estado de pre-eclosión, observada en *Hynobius leechii*, un urodelo (10).

En el desarrollo embrionario precoz de la rata se ha observado una curiosa coincidencia: se ha obtenido una curva de actividad arginásica (8) muy parecida a la que hemos encontrado en *B. spinolosus*, pues presenta un valor máximo cuando se han formado el tubo neural y el brote caudal y una disminución a fines de la embriogénesis.

Se plantea el problema de cuál sería la función que desempeñaría la arginasa en los comienzos del desarrollo. No se ha efectuado un estudio enzimático completo del ciclo de la ornitina en la embriogénesis de anfibios, de modo que no podría afirmarse categóricamente que la elevación que experimenta la arginasa vaya acompañada de aumento en la actividad de las otras enzimas. En todo caso, no puede negarse la posibilidad de que en este período funcione este ciclo, completo o incompleto, y que su actividad tenga que ver con el aporte de materias primas para la síntesis de otras sustancias (Fig. 1), además de la ureogénesis.

Estas posibilidades podrían resumirse así:

1) Las variaciones de la urea excretada al medio de cultivo encontradas en *B. vulgaris* (a partir del estado de blástula) (9) coinciden con las variaciones de la actividad arginásica que hemos encontrado, lo que pone de manifiesto la relación entre urea producida y actividad arginásica. No hay que olvidar, sin embargo, que a partir de la aparición del brote caudal el nitrógeno se excreta en su mayor parte en forma de amoníaco (9), alcanzando éste valores 10 o más veces su-

periores a la urea excretada en ese mismo período.

2) En el desarrollo embrionario del sapo se producen modificaciones cuantitativas y cualitativas de las proteínas, tal como lo indican las Figs. 4 y 5, el descenso del nitrógeno total (9) y las variaciones de las enzimas proteolíticas (21). Además, es sabido que la arginina es un aminoácido esencial para la síntesis proteica y, en particular, de las nucleoproteínas que poseen una parte proteica de carácter básico (30, 31, 32).

3) También el metabolismo de los ácidos nucleicos de los anfibios en desarrollo revela variaciones importantes (23, 25, 26) y se sabe que el ciclo de la ornitina está relacionado con la biosíntesis de las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas. El arginín-succinato puede transformarse en anhídrido arginino-succínico (33) el cual al desdoblarse puede dar ácido dihidro orótico, molécula básica en la síntesis de las pirimidinas, y ornitina, que puede volver al ciclo o bien transformarse en semi-aldehído glutámico y éste llegar a glutamina, sustancia que aporta los átomos de nitrógeno números 3 y 9 de la molécula purínica (34).

Puede concluirse que si el ciclo de la ornitina funciona, completo o incompleto, durante el desarrollo embrionario de *B. spinolosus*, antes de alcanzarse la condición ureotética del adulto (lo que es muy probable), seguramente tiene más relaciones con la biosíntesis de proteínas y de nucleótidos que con la ureogénesis, ya que ésta no es muy importante en esos períodos por cuanto la mayor parte del nitrógeno se elimina como amoníaco. En los urodelos el ciclo ureogénético probablemente tiene relaciones similares con los procesos de biosíntesis de proteínas y de nucleótidos.

SUMMARY

Modifications in wet weight, protein content and arginase activity during embryonic development of the toad *Bufo spinolosus* Wiegmann have been studied.

The stages used for the determinations are detailed in Fig. 2.

Variations in weight (Fig. 3) are mainly due to loss or incorporation of water from the environment.

The total amount of protein increased

during the first 3 hours (Fig. 5) until a level which remained constant during cleavage and blastula stage (45 hours). From 45 to 75 hours the total amount of protein increased again, in relation with an active protein biosynthesis. From 75 to 100 hours a decrease was observed, possibly due to reduction in the amount of yolk, to the loss of hatching enzymes and/or to other metabolic changes. Fluctuations in total protein followed the sediment protein changes because the proteins of the supernatant fraction exhibited an almost constant level. Arginase was found in the latter.

Arginase activity was low in the egg and even lower in the blastula stage (Fig. 4). An increase was observed from 45 to 100 hours. Modifications in arginase activity should be related not only with the elimination of nitrogen during embryogenesis, since it is excreted mainly as ammonia in this period, but also with some biosynthetic processes. This interpretation is supported by the relations of urea cycle with the synthesis of proteins, specially basic, and nucleotide synthesis (see Fig. 1).

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a las Srtas. Victoria Prajoux y María Plaza por su asistencia técnica y a los Drs. Luis Izquierdo, Juan Vergara, Hermann Niemeyer y Eduardo Bustos por sus valiosas sugerencias.

REFERENCIAS

- 1.—EAKIN, R. E. y FISHER, J. R. — En "A Symposium on the Chemical Basis of Development", Mc Elroy, W. D. y Bentley Glass eds. John Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1958, p. 514.
- 2.—BROWN, G. W., JR. y COHEN, P. P. — *Biochem. J.* **75**:82, 1960.
- 3.—FLORKIN, M. y MORGULIS, S. — "Biochemical Evolution", New York, Academic Press, 1949.
- 4.—BROWN, G. W., JR. y COHEN, P. P. — *J. Biol. Chem.* **234**:1769, 1959.
- 5.—BROWN, G. W., JR., BROWN, W. R. y COHEN, P. P. — *J. Biol. Chem.* **234**:1775, 1959.
- 6.—BALINSKY, J. B. y BALDWIN, E. — *J. Exp. Biol.* **38**:695, 1961.
- 7.—KENNAN, A. L. y COHEN, P. P. — *Develop. Biol.* **1**:511, 1959.

- 8.—MARTÍNEZ, C. — *Biológica*, **35**:25, 1963.
- 9.—URBANI, E. y DE CESARIS COROMALDI, L. — *Acta Embryol. Morph. Exp.* **1**:1, 1957.
- 10.—DOO BONG HA, YAN RIM LEE y HO SAM AHN. — *Chem. Abstr.* **64** (5):7099 g., 1966.
- 11.—CABELLO, J. — "La arginasa hepática". Santiago de Chile, Centro de Publicaciones Biológicas, Universidad de Chile, 1955.
- 12.—ROEDER, M. — *J. Cell. Comp. Physiol.* **50**:241, 1957.
- 13.—CABELLO, J., URBA, R., PRAJOUX, V. y BASILIO, C. — *Acta Physiol. Lat.* **9**:286, 1959.
- 14.—CABELLO, J., PRAJOUX, V., BASILIO, C. y PLAZA, M. — *Comp. Biochem. Physiol.* **6**:111, 1962.
- 15.—ELLIASON, E. — *Exp. Cell Res.* **30**:74, 1963.
- 16.—HAMBURGER, V. — "A Manual of Experimental Embryology". Chicago - Illinois, The University of Chicago Press, 1942.
- 17.—VALENCIA, J. — "Inducción de la ovulación y tabla de desarrollo normal de *Bufo spinulosus* Wiegmann (sapo de rulo)". Memoria de Prueba para optar al título de Profesor de Estado en Biología y Química, Univ. de Chile, 1960.
- 18.—SPIEGEL, M. — *Anat. Record*, **111**:544, 1951.
- 19.—ARCHIBALD, R. M. — *J. Biol. Chem.* **157**:507, 1945.
- 20.—MILLER, G. L. — *Anal. Chem.* **31**:964, 1959.
- 21.—URBANI, E. — *Advanc. Morphogen.* **2**:61, 1962.
- 22.—BROWN, M. G. — *J. Exp. Zool.* **88**:95, 1941.
- 23.—BRACHET, J. — "The Biochemistry of Development" New York, Pergamon Press, 1960.
- 24.—CHEN, P. S. — *Exp. Cell Res.* **21**:523, 1960.
- 25.—BRACHET, J. — En "Bulletin de l'Académie Royale de Belgique" - Séance du 12 Octobre 1963 - p. 862.
- 26.—BRACHET, J. — *Advanc. Morphogen.* **3**:247, 1964.
- 27.—BROWN, D. D. y CASTON, J. D. — *Develop. Biol.* **5**:412, 1962.
- 28.—BROWN, D. D. y CASTON, J. D. — *Develop. Biol.* **5**:435, 1962.
- 29.—FLICKINGER, R. A. — *J. Exp. Zool.* **131**:307, 1956.
- 30.—JOHNS, E. W., PHILLIPS, D. M. P., SIMPSON, P. y BUTLER, J. A. V. — *Biochem. J.* **77**:631, 1960.
- 31.—JOHNS, E. W. y BUTLER, J. A. V. — *Biochem. J.* **82**:15, 1962.
- 32.—HNILICA, L. S. y BUSCH, H. — *J. Biol. Chem.* **238**:918, 1963.
- 33.—RATNER, S. — *Advanc. Enzymol.* **15**:319, 1954.
- 34.—NIEMEYER, H. — "Bioquímica General". Santiago, Ediciones de la Universidad de Chile, 1964.