

ETAPA EMBRIONARIA DE LA DETERMINACION DEL ASA BULBOVENTRICULAR

M. EN C. GUILLERMINA PALLARES *

INTRODUCCIÓN

En algunos invertebrados como el celenterado *Ylyanassa*, la célula precursora del corazón se ha identificado en un blastómero (4D) en la etapa en que el huevo en segmentación ha formado 4 células (1), sin embargo, en los vertebrados la localización de estas áreas presuntivas organoformadoras ocurre en etapas más avanzadas del desarrollo y la detección de las células con capacidad cardiogénica se ha efectuado al inicio de la gastrulación (2). En el embrión de pollo se han localizado en la etapa blastular, inmediatamente antes de formarse la línea primitiva, como un grupo de células dispersas en todo el blastodermo, las cuales al iniciarse la formación de la línea primitiva, se restringen al extremo cefálico de ésta y al ocurrir la gastrulación se distribuyen en dos áreas laterales de mesodermo esplácnico que representan los campos morfogénicos de corazón (3-8) (Fig. 1), los que presentan las siguientes propiedades: capacidad de autorregulación, de autodiferenciación, determinación progresiva y capacidad de diferenciación distribuida en gradientes; cualidades comunes a los campos morfogénicos de otros órganos.

En los vertebrados, el corazón se desarrolla tempranamente, en el embrión de pollo, durante el estadio 5 de Hamburger y Hamilton (9); las áreas cardiogénicas se sitúan lateralmente al proceso cefálico y a la porción más anterior de la línea primitiva (4, 6, 7) (Fig. 1); en este estadio el em-

brión está gastrulando y las dos mitades del rudimento cardíaco inician su diferenciación independientemente; las áreas cardiogénicas están constituidas por cúmulos de mesénquima que emigran *cefalad* y *mediad*, utilizando como sustrato el mesodermo subyacente (7, 10, 11, 12, 13) y a medida que se mueven ocurre la angiogénesis formándose dos tubos endocárdicos cubiertos cada uno por el manto micopícardico (14, 15, 16); al iniciarse la tubulación del embrión los dos tubos endocárdicos se unen en la línea media y originan un corazón tubular primitivo (8, 17). Los mantos mioepicárdicos se fusionan y cubren el área ventrolateral del tubo endocárdico cuya pared dorsal se relaciona con el piso del intestino anterior. El tubo cardíaco queda así incluido en la cavidad pericárdica primitiva (17).

El tubo cardíaco primitivo está constituido por las siguientes cámaras cardíacas que mencionamos siguiendo la ruta de la circulación; seno venoso, atrios, ventrículo, *bulbus cordis* y tronco arterioso; del seno venoso deriva la porción sinusal de la aurícula derecha y el seno venoso coronario; los atrios forman las aurículas, el ventrículo desarrollará al ventrículo anatómicamente izquierdo, el *bulbus cordis al ventriculo* anatómicamente derecho y del tronco arterioso se formará la porción ascendente de la aorta y el tronco de la arteria pulmonar. Las cámaras cardíacas primitivas están separadas exteriormente por surcos que se corresponden con crestas interiores (17) (Fig. 2A).

Una vez constituido el tubo cardíaco se tuerce y origina el asa bulboventricular que

* Departamento de Morfología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.

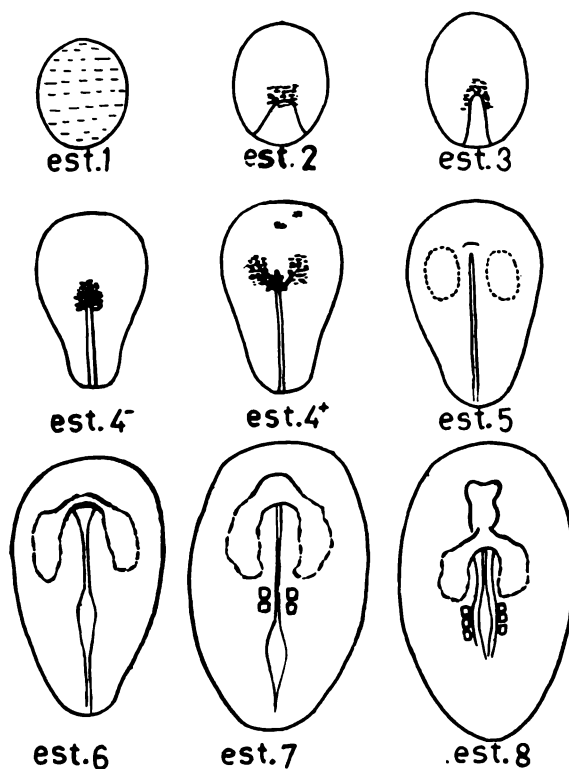


FIG. 1. Distribución de los campos morfogenéticos de corazón en estadios tempranos.

normalmente es convexa a la derecha y cóncava a la izquierda (18-22), lo que determina la posición normal de los ventrículos (Fig. 2B, C y D); simultáneamente a esta torsión las aurículas ascienden y ocupan una posición dorsocefálica con respecto a los ventrículos (Figs. 2E, F).

El objetivo de este trabajo es tratar de establecer la etapa en que el tubo cardíaco del embrión de pollo experimenta su determinación para torcerse y dar origen al asa bulboventricular.

Muchos esbozos de órganos adquieren la capacidad de autodiferenciación y automorfogénesis después de haber sido inducidos, lo que se pone de manifiesto cuando se extirpa el esbozo y se cultiva *in vitro*. En estas condiciones, lleva a cabo su diferenciación histológica y morfogénesis dentro de patrones muy similares a los normales (23, 26).

La observación anterior resulta importante también para la morfogénesis del corazón y plantea la necesidad de ubicar el momen-

to en que su esbozo adquiere capacidad de diferenciación. Antes de esta etapa podrían ejercerse sobre él acciones teratogénicas que modifiquen por ejemplo su torsión y provoquen invasiones del asa, mecanismo por el que se originan las inversiones ventriculares (27-28). Esto tiene interés actual para la patología cardiovascular congénita.

Por lo anterior decidimos emprender un experimento y confirmar en primer lugar, que el órgano problema está sometido durante las primeras etapas de su desarrollo a las acciones descritas, y en segundo, definir la etapa en que el tubo cardíaco del embrión de pollo adquiere su determinación para torcerse y originar el asa bulboventricular.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo utilizamos 130 embriones de pollo White leghorn incubados a temperatura de 37.5°C con humedad de 86-88%. El lote citado se dividió en dos grupos, el

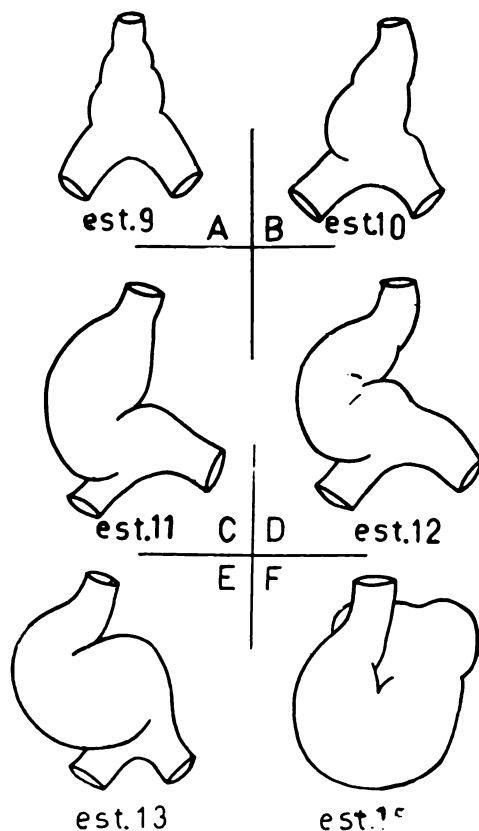


FIG. 2. Etapas de la torsión normal del asa bulboventricular en el embrión de pollo.

primero (Grupo A) formado por 100 embriones incubados por un período de 30 horas hasta el estadio 9 de la serie de Hamburguer y Hamilton (9); el segundo (Grupo B) constituido por 30 embriones, se incubó durante 25 horas hasta el estadio 8 de la misma serie. Al llegar al estadio requerido, los embriones de cada lote se sacaron y colocaron en un cristalizador que contenía solución salina al 9/1000, con el fin de separarlos del resto de vitelo, de ahí se pasaron a una caja de Siracusa y después de extenderlos y retirar el líquido sobrante con una pipeta, se marcó con carbón la región cefálica del tubo cardíaco y se procedió a extirpar el corazón utilizando agujas de cristal; inmediatamente se pasó el tubo cardíaco a otra caja de Siracusa que contenía el medio de cultivo compuesto por 50% de al-

búmina y 50% de Ringer,* se incubaron en una estufa Hot Pack a temperatura de 37.5°C y humedad de 100%.

De los 100 corazones del Grupo A, 7 se cultivaron durante 4 días; 28 durante 48 horas, 22, 30 horas y 43 se cultivaron solamente 24 horas.

Los 30 corazones del Grupo B se cultivaron 24 horas.

Se hicieron observaciones de estos cultivos cada 24 horas para determinar el grado de diferenciación morfológica (torsión del asa bulboventricular y disposición de las cavidades primitivas). Cuando ocurrió la torsión, algunos corazones se fijaron en alcohol de 70° y otros en fijador de Bouin, para fotografiarlos.

El desarrollo del asa bulboventricular fue seguido mediante diagramas y fotografías para lo cual algunos embriones se transparentaron y tiñeron (Técnica de Giemsa).

* Fórmula propuesta y comunicada personalmente por el doctor Nelson T. Spratt de la Universidad de Minnessota, EUA. +

RESULTADOS

Del Grupo A de 100 corazones, 62 presentaron torsión normal (Foto 2-8), 31 torsión invertida (Foto 9-11) y 7 formaron solamente vesículas. Por otra parte, 37 de estos corazones mostraron movimientos pulsátiles; este último grupo quedó repartido en los tres anteriores. (Cuadro).

En los 30 corazones del Grupo B, cultivados 24 horas, se observó formación de vesículas sin ninguna organización evidente que recordara al asa bulboventricular. (Foto 1). (Cuadro).

DISCUSIÓN

Como resultado de trabajos experimentales de embriología durante los últimos 50 años, se ha demostrado en forma concluyente que muchos esbozos de órganos adquieren capacidad para autodiferenciarse mediante procesos inductivos que parten de otros esbozos con los que mantienen estrecha relación (29-32). Esta capacidad de autodiferenciación incluye la morfogénesis propia de cada órgano y la diferenciación histológica, que avanzan hasta cierto grado.

La capacidad de autodiferenciación se manifiesta cuando se extirpa el esbozo del órgano y se cultiva *in vitro* (23-26), o se injerta en otro embrión (33, 34) de la misma especie y estadio, o a una membrana extraembrionaria como la corioalantoidea (35).

Cuando el esbozo adquiere capacidad para autodiferenciarse, ha experimentado su determinación. El concepto *determinación* tiene una connotación muy específica en embriología, se utiliza para expresar el estado cualitativo de las células que constituyen el campo morfogenético de un órgano y se manifiesta por la restricción progresiva de sus potencialidades y por el inicio de los procesos de síntesis proteínica que caracterizan al órgano o tejido. Las células embrionarias tempranas son multipotenciales, pueden originar cualquier tipo de tejido, pero en el momento en que experimentan la determinación, restringen esa potencialidad y se diferencian en un solo sentido.

Las áreas cardiogénicas son los campos morfogenéticos del corazón; sus células sin-

tetizan miosina (36) proteína contráctil característica del músculo.

La determinación puede conducir en primer lugar a delimitar la extensión del campo, separándolo de otros adyacentes y luego a delimitar las distintas regiones del mismo que van a originar diferentes partes del órgano. Aplicamos también la palabra determinación no sólo para indicar el comienzo de la diferenciación histológica sino también para referirnos a la etapa en que se establece el inicio irreversible de procesos morfogenéticos supracelulares tales como plegamientos, torsiones, crecimientos diferenciales y otros.

Los primordios de los órganos cultivados *in vitro* se desarrollan siguiendo patrones similares a los observados *in vivo*, siempre que contengan los elementos celulares esenciales para su diferenciación y después de haber experimentado la determinación.

Está bien establecido que cuando se extirpan las áreas cardiogénicas del embrión de pollo en el estadio 5 de Hamburger y Hamilton, y se cultivan *in vitro* o se injertan en una membrana corioalantoidea, estas áreas se diferencian en vesículas que muestran la estructura histológica del músculo cardíaco. De esto se ha concluido que la determinación para la diferenciación histológica de dichas áreas ha ocurrido en el estadio 5 ya citado (3, 6).

En anfibios se ha demostrado que el endodermo es el inductor del corazón (37). A pesar de los experimentos que se han hecho, aún no se ha demostrado en las aves el papel inductor del endodermo sobre el mesodermo cardiogénico (38, 39).

Una vez que el mesodermo cardiogénico ha sido inducido, entran en acción varios procesos supracelulares en el área cardiogénica tales como movimientos morfogenéticos (7, 12), engrosamientos (8), crecimientos diferenciales, plegamientos y rotaciones (18-22) y la organización del tubo cardíaco en tres capas (17, 40).

Se han emitido varias teorías para explicar las causas de la torsión del tubo cardíaco. Algunos autores apoyan la idea de que factores extrínsecos la determinan; Patten (41) y Van Mierop (42) opinan que la curvatura del corazón se debe al rápido crecimiento del tubo cardíaco en el interior de

una cavidad pericárdica que crece más lentamente, por lo que para poder acomodarse en esa cavidad el corazón tubular primitivo tiene que experimentar una torsión. Otros autores piensan que dicha torsión es mucho más compleja y se debe a procesos intrínsecos de las células (19-22). En experimentos realizados en anfibios, donde se aisló y cultivó el tubo cardíaco *in vitro*, se observó que en estas condiciones el corazón experimentaba curvatura, lo mismo ocurrió en los casos en que se produjo *cardia bifida* (43).

Manasek trabajando con embriones de pollo del estadio 9 ya citado explantados sobre un medio isotónico con 140 mM de K⁺, inhibió las pulsaciones cardíacas y a pesar de ello el asa bulboventricular se formó; de estos resultados el autor concluye que la morfogénesis temprana del corazón es independiente de la función (44).

Orts-Llorca al hacer homoinjertos del tubo cardíaco de embrión de pollo en estadios 9, 10 y 11, y colocarlos en la cavidad celómica, concluyó que la curvatura cardíaca sólo se manifiesta si el corazón se desarrolla dentro de una cavidad semejante a la pericárdica, puesto que los embriones que quedaron incluidos dentro del mesénquima del hospedero no presentaron torsión (20). De sus experiencias debería concluir más acertadamente que el tubo cardíaco necesita un espacio para su desarrollo, no necesariamente tiene que ser la cavidad pericárdica o celómica, sino incluso un volumen de medio de cultivo que le permita torcerse. Para probar que el corazón se curva en otras cavidades que no sean la pericárdica debe escogerse el estadio adecuado que en este caso sería antes de que se inició la formación del asa y en sus experimentos dicho autor utilizó los estadios 9, 10 y 11 aunque los dos últimos son inadecuados para este fin puesto que en ellos se observa ya asimetría del asa. También es inadecuada su metodología para tratar de demostrar el papel que juegan los factores extrínsecos en la torsión, puesto que al hacer homoinjertos no puede descartar las influencias que emanan del mismo embrión. Creemos que nuestra metodología sería más adecuada para este fin, ya que se observa la torsión del tubo cardíaco cuando se extirpa en el esta-

dio 9 y se cultiva *in vitro*. Con esta técnica el corazón queda aislado de las posibles influencias que podrían surgir de otras estructuras del embrión. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de Bacon para anfibios (43) con lo que se descarta la teoría mecanicista de Patten y Van Mierop quienes ponen énfasis en el papel decisivo que podrían ejercer los factores extrínsecos sobre la formación del asa bulboventricular.

Nuestros experimentos demuestran que antes del estadio 8 de Hamburger y Hamilton, las células del corazón tubular (aunque ya han empezado a diferenciarse histológicamente y han alcanzado cierto grado de morfogénesis) aún no experimentan la determinación para formar el asa bulboventricular, puesto que cuando se extirpa el corazón en este estadio se forman vesículas pulsátiles que no recuerdan la organización normal de este órgano. En cambio cuando se extirpa el corazón en el estadio 9 se forma el asa bulboventricular. De nuestro lote experimental constituido por 100 embriones, 93 desarrollaron asas bulboventriculares normales en la mayoría de los casos si se comparan con las de los embriones testigo equivalentes al mismo estadio.

En este último grupo, los períodos de cultivo nos permitieron observar el desarrollo morfológico del tubo cardíaco ya que el tiempo mínimo de los mismos (24 horas) sumado a las 30 horas de incubación anterior nos da un estadio en el que normalmente ya ocurrió la torsión bulboventricular.

CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro trabajo experimental nos permiten reforzar los siguientes hechos de acuerdo a nuestros objetivos e hipótesis, y a observaciones realizadas por algunos investigadores.

1. El esbozo cardíaco del embrión de pollo adquiere capacidad de diferenciación después de haber sido inducido puesto que continúa su desarrollo fuera del organismo.
2. La etapa del desarrollo en que queda "determinado" para efectuar la torsión

corresponde al estadio 9 de la escala propuesta por Hamburger y Hamilton. Antes de ella el desarrollo no concuerda con los patrones normales.

3. La torsión e incurvamiento del esbozo obedece a factores intrínsecos del mismo (y no a problemas de espacio o simples factores mecánicos), lo que ha sido demostrado por otros autores en anfibios y confirmado por nuestro experimento en las aves.
4. El establecimiento de la etapa en que ocurre la determinación del asa bulboventricular, es útil y puede servir co-

mo marco de referencia para futuros trabajos relacionados con la producción de inversiones del asa.

Problemas colaterales que surgen de este trabajo

Quedan por investigar los procesos o estructuras embrionarias que provocan la determinación para la torsión del tubo cardíaco y el papel de la hemodinámica sobre la histogénesis del corazón ya que en el presente trabajo los corazones explantados carecen de circulación y esta metodología no permite llegar a conclusiones a este respecto.

Grupos	Número de embriones	Estadio del desarrollo *	Hrs. de cultivo in vitro	A S A		Vesículas Pulsátiles
				Bulboventricular Normal	Invertida	
A	100	9 (30 horas)	24-96	62	31	7
B	30	8 (25 horas)	24			30

* Según Hamburger y Hamilton.

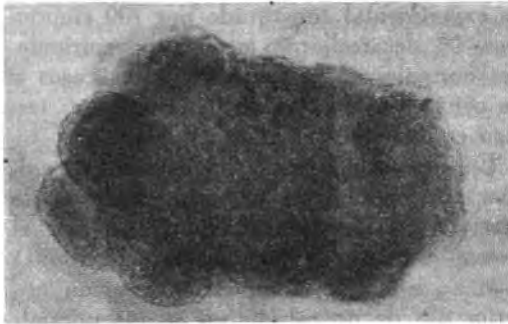


Foto 1. Corazón de estadio 8 cultivado durante 24 horas en el que se observa la formación de vesículas.

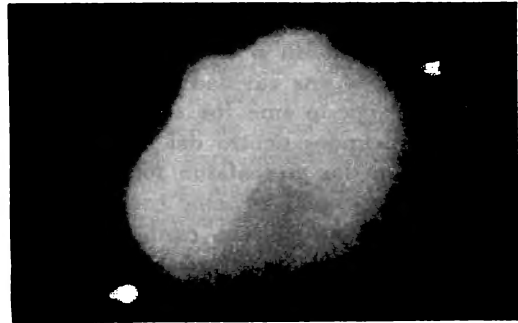


Foto 2. Corazón de estadio 9 cultivado durante 48 horas en el que se observa torsión normal del asa bulboventricular.

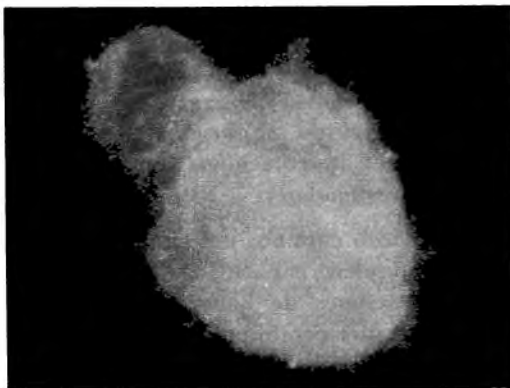


Foto 3. Corazón de estadio 9 cultivado durante 48 horas en el que se observa torsión normal del asa bulboventricular.

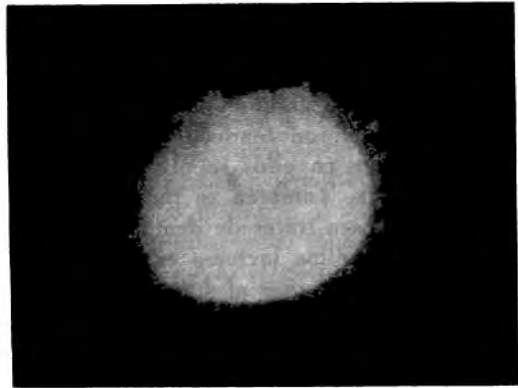


Foto 4. Corazón de estadio 9 cultivado durante 48 horas en el que se observa torsión normal del asa bulboventricular.

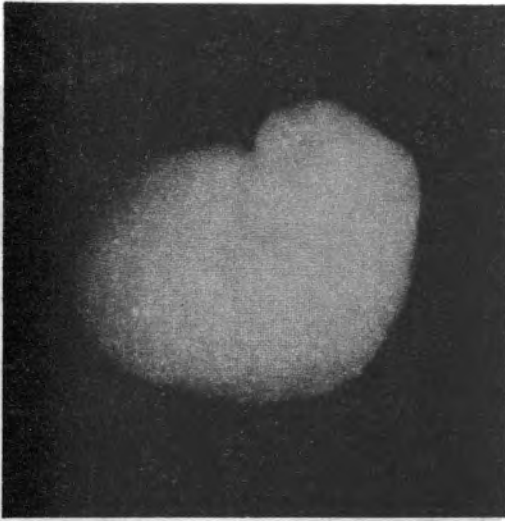


Foto 5. Corazón de estadio 9 cultivado durante 48 horas en el que se observa torsión normal del asa bulboventricular.



Foto 6. Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días en el que se observa torsión normal del asa bulboventricular.

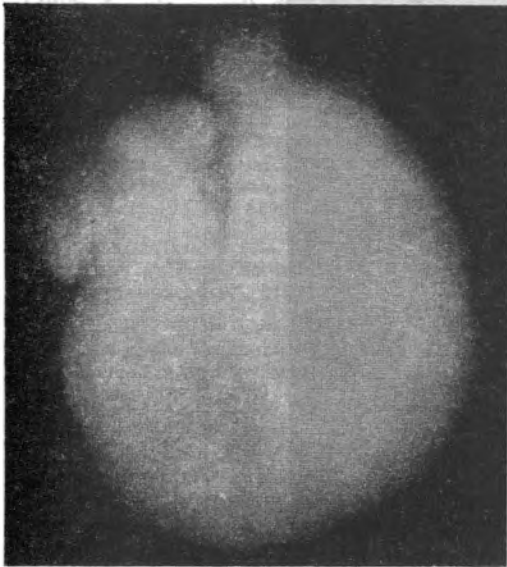


Foto 7. Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días con torsión normal del asa bulboventricular.

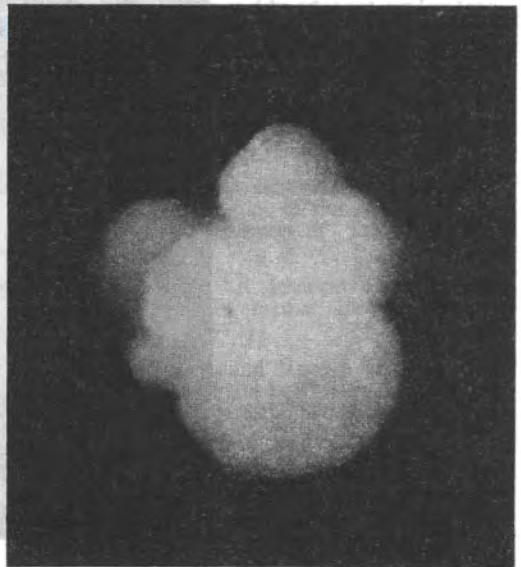


Foto 8 Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días con torsión normal del asa bulboventricular.



FOTO 9. Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días, presenta torsión invertida del asa bulboventricular.



FOTO 10. Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días, presenta torsión invertida del asa bulboventricular. Se observa la marca de carbón en la porción cefálica del tronco cono.

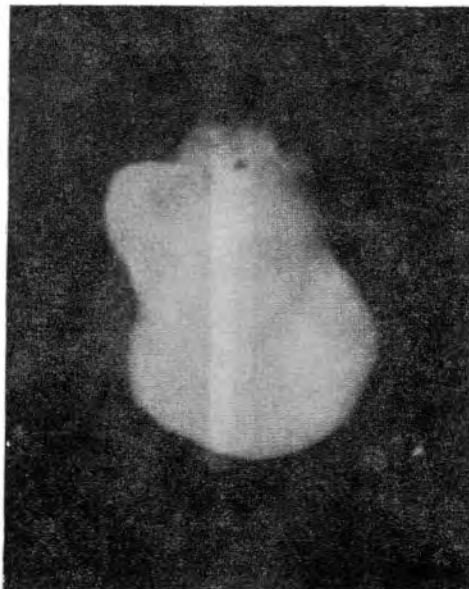


FOTO 11. Corazón de estadio 9 cultivado durante 4 días, presenta torsión invertida del asa bulboventricular. Se observa la marca de carbón en la porción cefálica del tronco cono.

RESUMEN

Cuando un esbozo embrionario ha experimentado inducción puede autodiferenciarse y alcanzar cierto grado de morfogénesis al ser explantado y cultivado fuera del embrión.

La observación periódica de cultivos de esbozo cardíaco de embrión de pollo mostró que los explantes del estadio 8 de Hamburger y Hamilton formaron vesículas pulsátiles, por otra parte en el 93% de los corazones cultivados en el estadio 9 se observó formación de asa bulboventricular; es en esta etapa cuando el esbozo del órgano adquiere la determinación para el desarrollo del asa.

SUMMARY

When an embryonic primordium has been induced it can be autodifferentiated and achieve certain degree of morphogenesis when it is explanted and cultured out of the embryo. The periodic observation of the heart primordium cultures of the chick embryo, showed that stadium eight explants of Hamburger and Hamilton formed pulsatile vesicles, on the other part in 93% of cultured hearts in stadium nine it was observed the formation of the bulbo ventricular loop; it is in this stage when the primordium of the organ acquires the determination for the loop development.

BIBLIOGRAFIA

1. CLEMENT, A. C.: "Development of *Ilyanassa* Following Removal of the D Macromere at Successive Cleavage Stages", *J. Exptl. Zool.* 149: 193-216 (1962).
2. WILLIER, B. H., WEISS, P. A. and HAMBURGUER, W.: "Analysis of Development" Ed. W. B. Saunders, pp. 441 (1955).
3. BUTLER, E.: "The Development Capacity of Regions of the Unincubated Chick Blastoderm as Tested in Chorioallantoic Grafts", *J. Exptl. Zool.* 70: 357-389 (1935).
4. SPRATT, N. T.: "Location of Organ-Specific Regions and Their Relationship to the Development of the Primitive Streak in the Early Chick Blastoderm", *J. Exptl. Zool.* 89: 69-101 (1942).
5. RUDNICK, D.: "Teleosts and Birds, Analysis of Development", B. H. Willier, P. A. Weiss, and V. Hamburger, eds. Philadelphia: Saunders, pp. 297-314 (1955).
6. RAWLES, M. E.: "The Hearth-forming Areas of the Early Chick Blastoderm", *Physiol. Zool.* 16: 22-42 (1943).
7. ROSENQUIST, G. C., and DE HAAN, R. L.: "Migration of precardiac cells in the chick embryo: a radioautographic study", *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.* 38, 111-121. (1966).
8. STALSBERG, H., and DEHAAN, R.: "The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo". *Develop. Biol.* 19, 128-159 (1969).
9. HAMBURGUER, V., and H. L. HAMILTON.: "A series of normal Stages in the Development of the Chick Embryo", *J. Morphol.* 88: 49-92 (1951).
10. DEHAAN, R. L.: "Organisation of The Cardiogenic Plate in the early chick Embryo", *Acta Embryol. Morph. exp.* 6, 26-38 (1963).
11. DEHAAN, R. L.: "Development of form in the embryonic heart. An experimental approach". *Circulation* 35, 821-833 (1967).
12. DEHAAN, R. L.: "Migration Patterns of the Precardiac Mesoderm in the Early Chick Embryo", *Exptl. Cell Res.* 29: 544-560 (1963).
13. DEHAAN, R. L.: "Morphogenesis of vertebrate heart. In Organogenesis". (ed. R. L. De Haan and H. Ursprung) pp. 377-419 New York: Holt (1965).
14. MANASEK, F. J.: "Embryonic development of the heart". II. Formation of the epicardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22. 333-348 (1969).
15. MANASEK, F. J.: "Histogenesis of the embryonic myocardium". *Amer. J. Cardiol.* 25, 149-168. (1970 a).
16. MANASEK, F. J.: "Embryonic Development of the heart". I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morphol.* 125, 329-366 (1968 b).
17. DE LA CRUZ, M. V., MUÑOZ-ARMAS, S., and MUÑOZ-CASTELLANOS, L.: "Development of the chick heart". *Johns Hopkins Press.* (1971).
18. BUTLER, J. K.: "An experimental analysis of cardiac loop formation in the chick". M. A. Thesis, The University of Texas. Austin. (1952).
19. MANASEK, F. J.: "A descriptive and experimental analysis of cardiac looping". *Anat. Rec.* 172, 362 (1972).
20. ORTS-LLORCA, F. and RUANO GIL, D.: "A causal analysis of the heart curvatures in the chick embryo", *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech Organ.* 158, 52-63 (1967).
21. STALSBERG, H. C.: "The origin of heart asymmetry: right and left contributions to the early chick embryo heart", *Dev. Biol.* 19, 109-127 (1969 a).
22. STALSBERG, H. C.: "Mechanism of dextral looping of the embryonic heart", *An. J. Cardiol.* 25, 265-271 (1970).

23. GROBSTEIN, C.: "Tissue interaction in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments in vitro". En: *Aspects of Synthesis and order in growth*. Ed. by D. Rudnick, *Univer. Press Princeton*, pp. 233-256 (1955).
24. WOLFF, ET.: "Principe d'une méthode de culture d'organes Embryonnaires en milieux Synthétiques", *Comp. Rend. Biol.* 147: 857-861 (1953).
25. SPOONER, B. S. and WESSELLS, N. K.: "Mammalian Lung Development: Interactions In Primordium Formation and Bronchial Morphogenesis", *J. Exptl. Zool.* 175: 445-454.
26. SERGEI SOROKIN: "Recent Work on Developin Lungs". In *Organogenesis* (ed. R. L. DeHaan H. Urspring) pp. 467-491 Nueva York: Holt (1965).
27. DE LA CRUZ, M. V., ESPINO-VELA, J., ATTIE, F. y MUÑOZ, L.: "An Embryologic Theory for: Ventricular Inversions and the Clasificación", *An Heart J.* 73: 777-793 (1967).
28. DE LA CRUZ, M. V., MUÑOZ-CASTELLANOS, L., ESPINO-VELA, J. y ATTIE, F.: "Inversiones Ventriculares". Barcelona España: Ed. Científico-Médica, (1971).
29. SPEMANN, H., and MANGOLD, H.: "Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species", *Foundation of Experimental Embryology*. Ed. por Benjamin H. Willier y Jane M. Oppenheimer, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs N. J.
30. STRUDEL, G.: "Autodifferentiation et induction de Cartilage à partir de Mésenchyme somitique de Poulet Cultivé in vitro", *J. Embryol Exp. Morphol* Vol. 11, 399-412 (1963).
31. DAMERON, F.: "L'Influence de Divers Mésenchymes sur la Differentiation de l'Epithelium Pulmonaire de l'Embryon de Poulet en Culture in vitro", *J. Embryol Exptl. Morphol.* 9: 628-633 (1961).
32. GOLOSOW, N. and GROBSTEIN, C.: "Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis", *Dev. Biol.* 4, 242-255 (1962).
33. ORTS-LLORCA, F., and JIMÉNEZ COLLADO, J.: "The Development of Heterologous Grafts, Labeled with Thymidine-³H in the Cardiac Area of the Chick Blastoderm", *Develop. Biol.* 19, 213-227 (1969).
34. CHESTERMAN, F. C., and L. M. FRANKS: "Heterotransplantation and Organ Culture of Human Embryonic Lungs", *J. Pathol. Bact.* 79: 123-129 (1960).
35. WILLIER, B. H., and RAWLES, M. E.: "Developmental relations of the heart and liver in the Chorioallantoic grafts of whole Chick Blastoderms", *Anat. Rec.* 48, 277-302 (1931).
36. EBERT, L. D.: "Analysis of the Synthesis and Distribution of the Contractile Protein, Myosin in the Development of the Heart", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 39: 333 (1953).
37. BUTLER, J. K.: "Self-differentiation and induction in the heart amblystoma", *J. Exptl. Zool.* 98, 87-125 (1952).
38. ORTS-LLORCA, F.: "Influence of the Endoderm on Heart Differentiation during the Early Stages of Development of the Chicken Embryo", *Arch. Entwicklungsmech.* 154: 533-551 (1963).
39. DEHAAN, R. L.: "Cell Interactions and Oriented Movements during Development", *J. Exptl. Zool.* 157: 127-138 (1964).
40. DE VRIES, P. A., and SAUNDERS, J. B.: "Development of the Ventricles and Spiral Outflow Tract in the Human Heart", A contribution to the Development of the Human Heart from Age Group IX to Age Group XV. *Contributions to Embryology*. Vol. XXXVII No. 256 pp. 87-114.
41. PATTEN, B. M.: "Formation of the Cardiac Loop in the Chick", *Am. J. Anat.* 30: 373-397 (1922).
42. MIEROP, L. H. S., VAN, R. D. ALLEY, H. W. KAUSEL, and STRANAHAN: "Pathogenesis of transposition complexes", I. Embryology of the ventricles and great arteries", *Amer. J. Cardiol.* 12, 216-225 (1963).
43. BACON, R. L.: "Self-differentiation and Induction in the Heart of the Amblystoma", *J. Exptl. Zool.* 98: 87-121 (1945).
44. MANASEK, F. J., and MONROE, R. G.: "Early Cardiac Morphogenesis Is Independent of Function", *Developmental Biology* 27, 584-588 (1972)