

CATEDRA DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA  
GENERAL Y DE ANATOMIA PATOLOGICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA CITODIFERENCIACION  
DEL MIOCARDIO DE EMBRION DE POLLO  
" IN VIVO " E " IN VITRO "

Memoria presentada para la obtención del  
Grado de Doctor en Medicina y Cirugía  
por

José Antonio Bombí Latorre

Barcelona, 1973

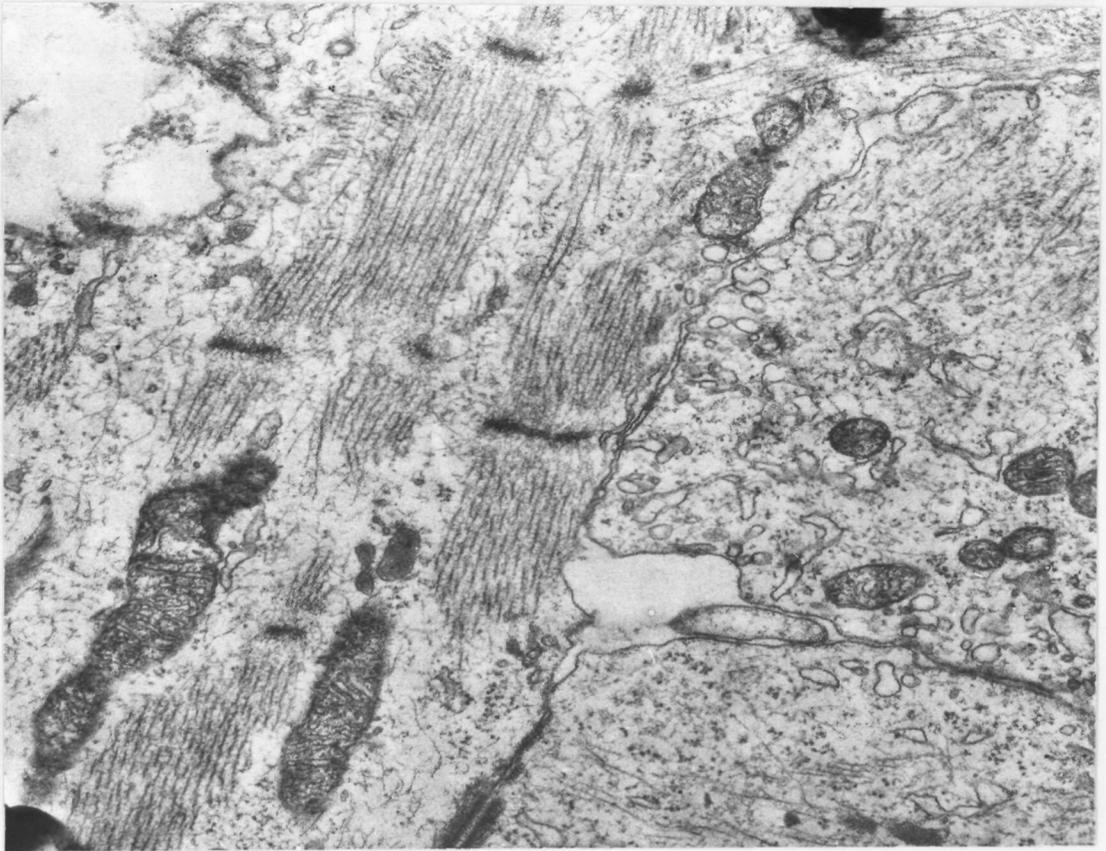


Fig. 52 : Embrión de 4 días cultivado 10 días.  
Miocitos en los que se distinguen algunas miofibrillas  
y abundantes filamentos intermedios dispersos en su sar-  
coplasma. Obsérvese la escasez de ribosomas. 33.000 X.

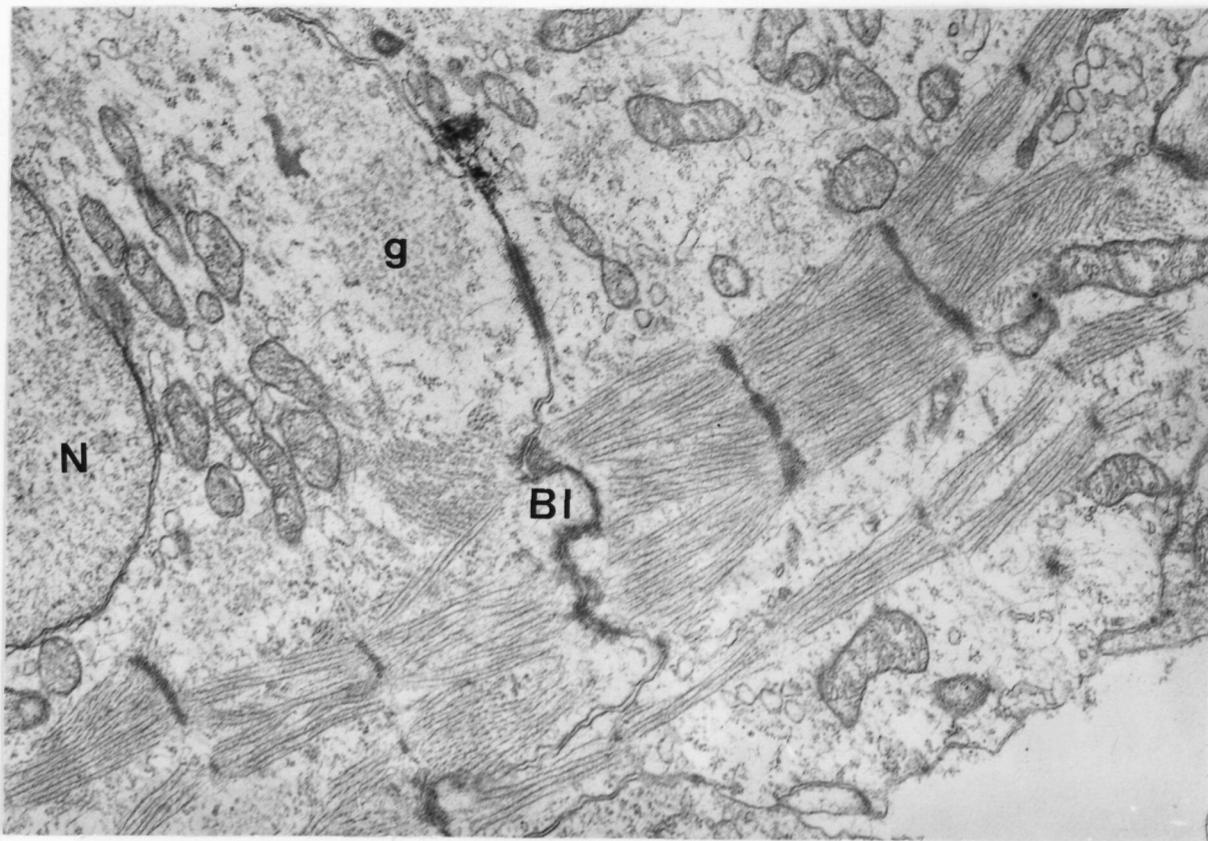


Fig. 53 : Embrión de 4 días cultivado 13 días.  
Miocitos en cuya zona de contacto se evidencia una Banda Intercalar (BI) bastante bien diferenciada.  
N - núcleo ; g - glucógeno. 27.500 X.

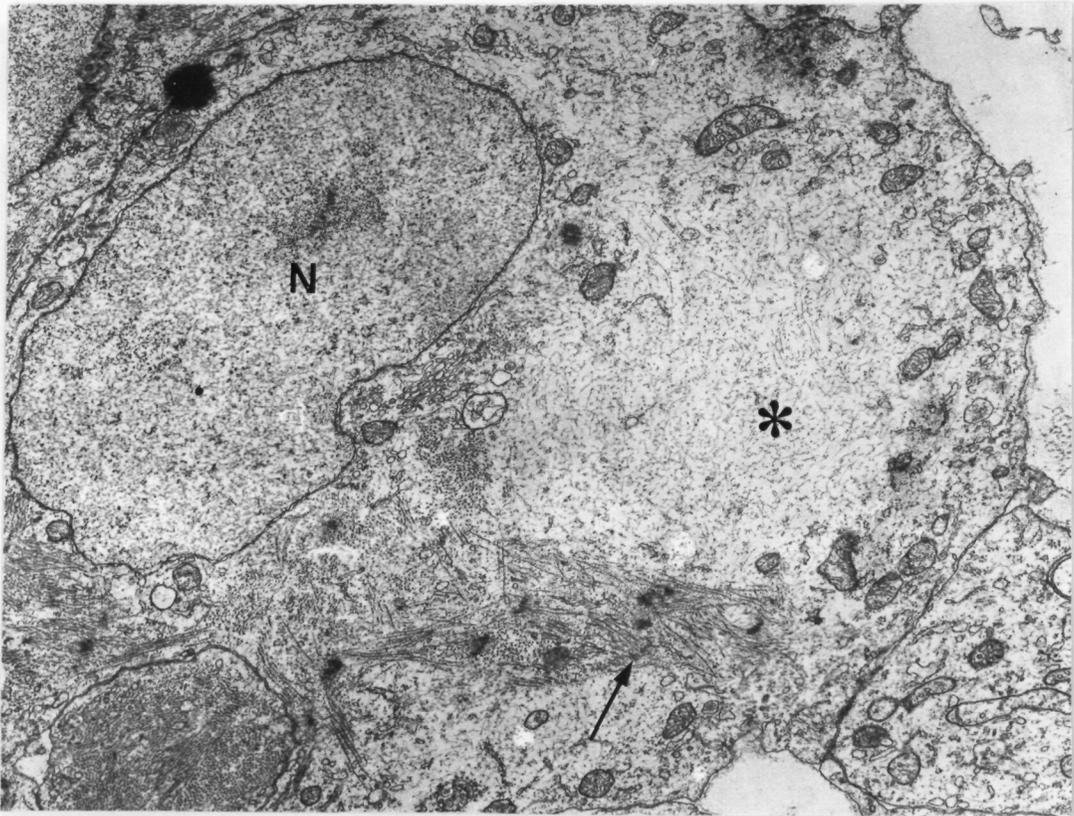


Fig. 54 : Embrión de 4 días cultivado 13 días.  
Miocito con abundantes filamentos intermedios agrupados  
en una zona libre de organoides (asterisco). También  
se observan miofibrillas desorganizadas (flecha).

N- núcleo

22.000 X.

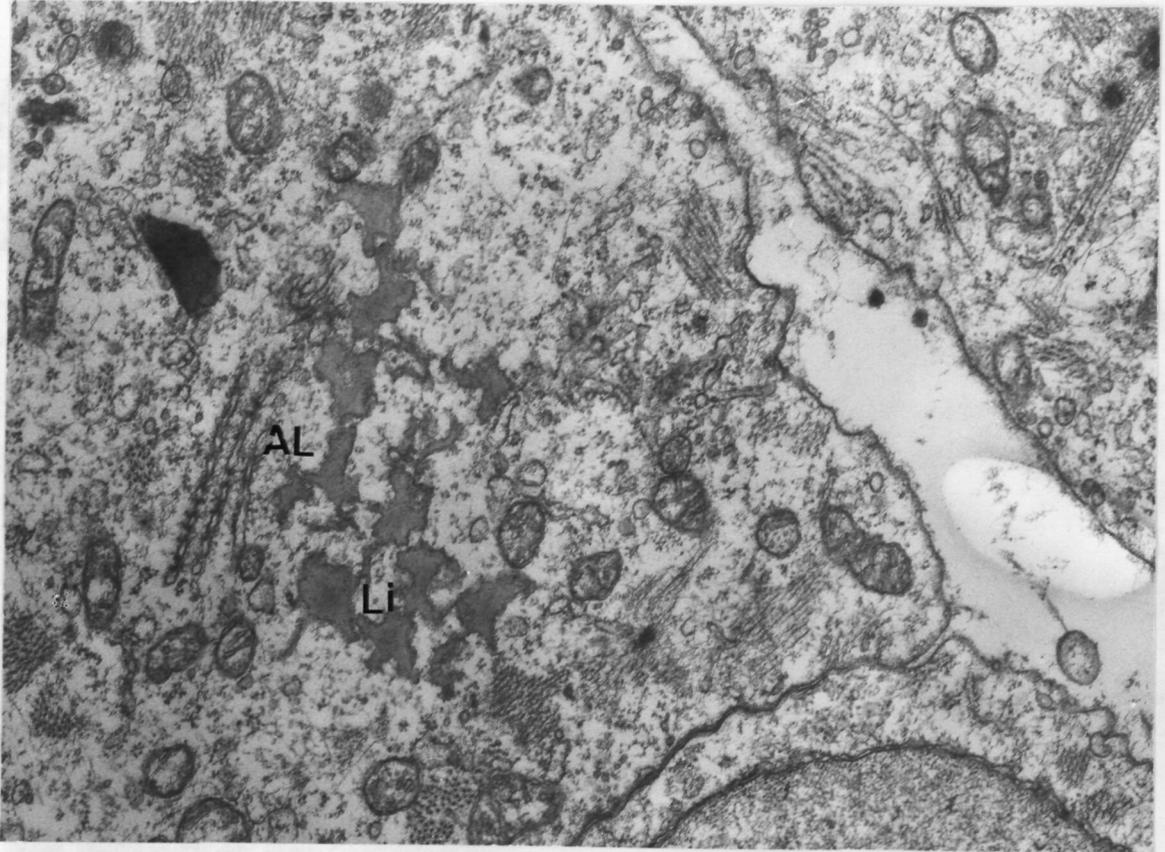


Fig. 55 : Embrión de 4 días cultivado 15 días.  
Miocito con algunos depósitos de lípidos (Li) y un  
"annulate lamellae" bilaminar (AL). En el espacio in-  
tercelular se encuentran unas partículas de aspecto ví-  
rico.

27.500 X.

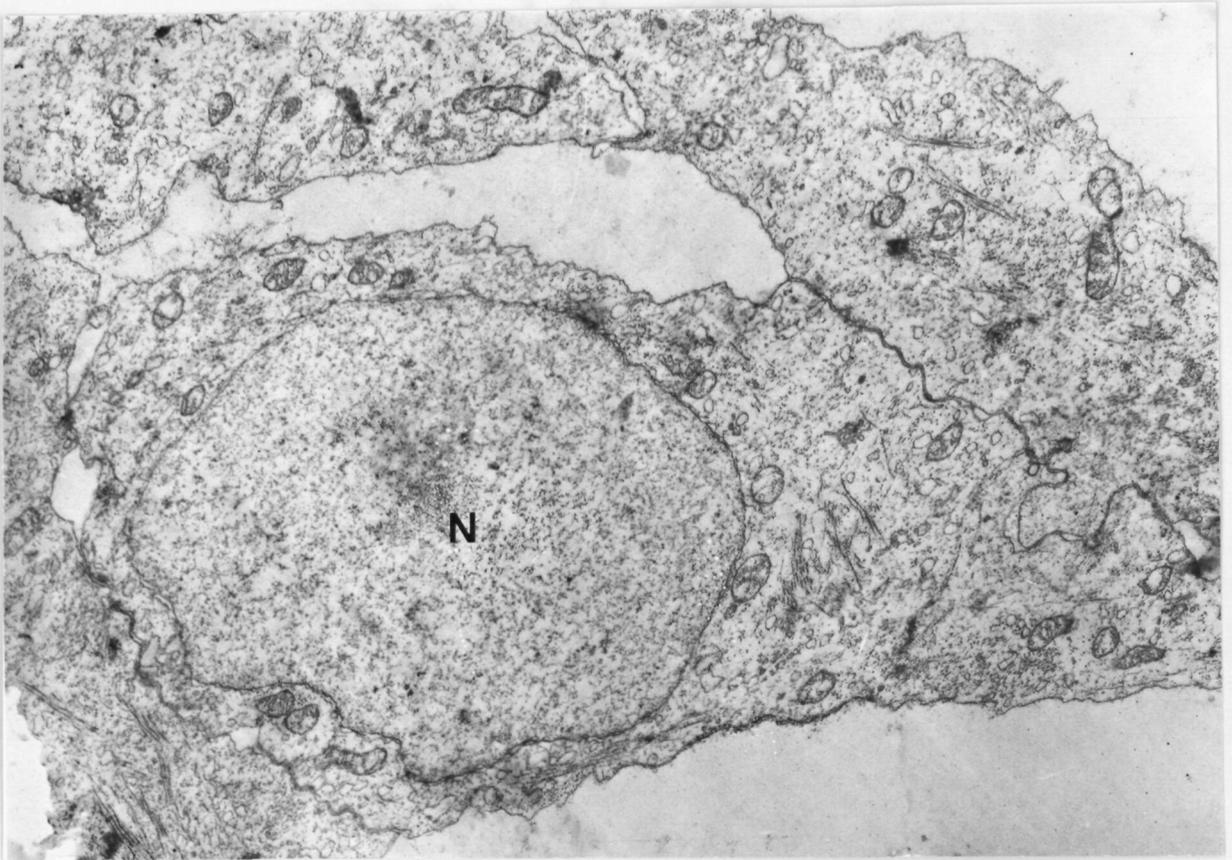


Fig. 56 : Embrión de 4 días cultivado 17 días.  
Miocitos con citoplasmas relativamente claro, conser-  
vando sólo pocos filamentos gruesos.

N - núcleo

16.500 X.



Fig. 57 : Embrión de 4 días cultivado 17 días.  
Cilio perteneciente a un fibroblasto, que muestra la  
estructura filamentosa de su cuerpo basal (C).

55.000 X.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS  
OBTENIDOS EN EL MATERIAL EMBRIONARIO

El corazón de embrión de pollo empieza a latir al tener unos 8-9 somitos, al comienzo del 2º día de incubación (7, 70, 199, 224, 231) en forma de contracciones incoordinadas, que aparecen en el borde derecho del ventrículo y que se hacen rítmicas aproximadamente a las 36 horas, al tener 9 somitos el embrión.

A pesar de latir en estadios tan iniciales, no se observan en los miocitos cardíacos, miofibrillas al estudiarlos con el microscopio óptico, pero sí con el microscopio electrónico, pues ORTIZ LLORCA y GONZALEZ DE SANTANDER (191) ya las encuentran en el estadio 9, aproximadamente a las 33 horas, y MANASEK (149) en el estadio 10 a las 38 horas. También MEYER y QUEIROGA (166) han encontrado con el microscopio electrónico miofibrillas en las células miocárdicas, en explantes de embriones enteros de pollo, al fijarlas al aparecer la primera contracción.

HOLTZER (101) mediante inmunofluorescencia ha hallado miofibrillas estriadas antes del primer latido cardíaco, en material cultivado.

El material "in vivo" estudiado por nosotros,

latía en todas las ocasiones de forma rítmica y coordinada, y las células mas indiferenciadas poseían en su sarcoplasma miofibrillas muy primitivas, que en ocasiones eran simplemente haces de filamentos paralelos entre sí.

Durante el desarrollo embrionario, la diferenciación no está sincronizada en todas las células, sino que es posible encontrarnos con células muy indiferenciadas junto a células con miofibrillas, relativamente maduras.

Estas células más indiferenciadas, observamos que poseen una gran abundancia de conductos de Retículo Endoplasmático rugoso, que es característico de células con gran actividad secretoria extracelular, y que según GESSNER y cols. (66) y MANASEK (149, 154) sería debido a que probablemente estas células serían las que elaborarían la "gelatina cardíaca" ( cardiac jelly ), proceso que finalizaría antes del tercer día.

La forma de originarse los miofilamentos, y su orden de aparición en el mioblasto, ha sufrido muchas controversias, no estando aún esclarecido; así HAY ( 84, 85, 86) y DESSOUKY y HIBBS (33) creían que ambos miofila-

mentos finos y gruesos aparecían al mismo tiempo, por el contrario, PRICE, HOWES y BLUMBREG (208), ALLEN y PEPE (2) y OBINATA (179) sugerían que los primeros en aparecer eran los filamentos finos.

Nosotros en los mioblastos más primitivos ó indiferenciados hemos encontrado ambos tipos de filamentos finos y gruesos. (Fig. 8)

Los filamentos de miosina aparecen primero de forma desordenada y dispersos en el sarcoplasma, ordenándose paulatinamente en haces paralelos entre sí, posiblemente al imbrincarse con los filamentos finos de actina, de acuerdo con ALLEN (1).

Estos mismos mioblastos tienen una extensa malla de filamentos delgados, (Fig. 3,7,9) entrecruzados entre sí, en ocasiones incurvados, de diámetros y longitudes variables, que muchos autores creyeron inicialmente que eran de actina (2, 33, 49, 53, 54, 84,85,86, 208, 210) y que OBINATA y cols. (179) al estudiarlos con métodos experimentales sugirieron que eran filamentos de F-actina. Posteriormente, ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER (119), KELLY (126) y RASH y cols. (214, 216, 217) observan que dichos

filamentos no son todos iguales, como ya anteriormente había señalado HEUSON-STIENNON (90), sino que tienen diámetros variables entre 30 y 130  $\overset{\circ}{\text{Å}}$ , e incluso muchos de ellos tienen una longitud superior a la de los filamentos de actina, que es de 1  $\mu$ ; por lo que llegaron a la conclusión de que en parte eran filamentos de actina y los restantes, de un diámetro promedio de 100  $\overset{\circ}{\text{Å}}$ , unos filamentos que denominaron Filamentos Intermedios. Según NEWSTEAD (177) los filamentos más delgados de 30 a 40  $\overset{\circ}{\text{Å}}$  serían de actina globular ( G-actina ) y los de 40 a 90  $\overset{\circ}{\text{Å}}$  de F-actina.

ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER (120) demostraron posteriormente la existencia de filamentos que formaban complejos " en punta de flecha ", al conjugarse con Meromiosina pesada, en múltiples células como condroblastos, células nerviosas, fibroblastos y células epiteliales, pero no formaban dichos complejos estos filamentos Intermedios de 100  $\overset{\circ}{\text{Å}}$ . Por otra parte RASH y cols. (216) observaron que estos filamentos diferían bioquímicamente de los de actina y de los de miosina.

Muy recientemente han sido aislados filamentos parecidos en los mixomas cardíacos ( FERRANS y cols.

48 ), lo que corroboraría las hipótesis de RASH y cols. (217) y TRELSTAD y cols. (256), de que dichos filamentos Intermedios serían restos de las células mesenquimales primitivas y estarían en relación con su movimiento.

En nuestras observaciones estos filamentos son muy abundantes inicialmente, pero se van reduciendo progresivamente con el desarrollo embrionario.

KELLY (126) cree que dichos filamentos no intervendrían en la miofibrillogénesis, pero quizás sí en la formación de las líneas Z.

Los primeros filamentos gruesos en aparecer se encuentran desordenadamente dispersos por el sarcoplasma y entrecruzados entre sí, sin ninguna relación con ningún otro componente celular. Posteriormente estos filamentos se agrupan paralelamente entre sí, en haces, generalmente en las zonas periféricas del sarcoplasma. En muchas ocasiones podemos observar como estos miofilamentos gruesos se encuentran anclados convergentemente hacia una condensación de la membrana del tipo "fascia ó zónula adherens". Más adelante observamos como en los extremos de estos haces, aparece una zona densa, inicialmente redondeada, que

ha sido denominada cuerpo Z ( 51)(Fig. 4,6), de mayor grosor que el de una banda Z adulta, pero sin estar en contacto directo, ya que entre ambos elementos se encuentran haces de filamentos finos, en ocasiones muy difíciles de visualizar. Esta formación que ya podemos considerar una miofibrilla inicial, se encuentra casi siempre por debajo del sarcolema, en la región periférica del sarcoplasma, pero en nuestro material "in vivo" no hemos encontrado en ninguna ocasión un engrosamiento nodular denso del sarcolema que fuera el origen de la línea Z (90), ni tampoco ninguna asociación entre la línea Z y los desmosomas, como han señalado GRIMLEY y EDWARDS (72) y HAGOPIAN y SPIRO (76).

Estas miofibrillas iniciales pueden ser varias en una misma célula, sin guardar inicialmente ninguna ordenación entre sí.

HIBBS (95) describe esta formación ya entre las 30 y 36 horas de incubación, y al parecer es a partir de este momento que aparece la actividad contráctil, como han visto RUMERY y cols. (126) y MEYER y QUEIROGA (166) en material cultivado.

Algunos autores (126) encuentran inicialmente unos ovillos apretados de filamentos finos de unos  $60 \text{ \AA}$  de diámetro, en zonas subsarcolémicas, que creen que serían el inicio de la miofibrillogénesis, pero esta formación según FISCHMAN (55) es rara encontrarla en el músculo cardíaco y esquelético "in vivo". Nosotros lo hemos encontrado en muy raras ocasiones (Fig. 7), por lo que suponemos que no debe intervenir en la miofibrillogénesis, ya que en este caso sería más generalizado y perduraría durante más tiempo en el desarrollo embrionario.

Estos filamentos agrupados en haces y en miofibrillas están ya ordenados en forma hexagonal como en el adulto, lo que se observa muy bien en secciones transversales, por lo que creemos que ya inicialmente deben estar asociados ambos tipos de miofilamentos.

Hoy se acepta que ambos tipos de filamentos aparecerían simultáneamente ( 14, 33, 49, 53, 84, 85, 86, 90 ) y que la parente desproporción que señalan algunos autores ( 53, 54, 210) sería debida a la existencia de los filamentos Intermedios de ISHIKAWA y cols. (119).



Las miofibrillas con la diferenciación van creciendo en grosor y en longitud, uniéndose a ellas nuevos haces de filamentos a continuación del último cuerpo ó línea Z; al mismo tiempo se van orientando según el eje mayor celular, es decir entre lo que serán las dos bandas intercalares, de tal forma que al adquirir suficiente anchura comprimen de tal modo al resto de los organoides, principalmente las mitocondrias, que éstas a su vez quedan orientadas en la misma dirección formando largas cadenas.

El crecimiento de las miofibrillas en grosor parece realizarse en su periferia, en donde MORKIN (169) ha localizado autorradiográficamente la síntesis de proteínas contráctiles, y en donde se encuentran gran cantidad de ribosomas y polisomas. (Fig. 6, 12).

Las miofibrillas adultas en sus extremos distales están siempre en relación con las bandas intercalares a través de los filamentos finos.

Todas estas células que se están diferenciando tienen una gran cantidad de ribosomas distribuidos por

todo el sarcoplasma, que ya fueron descritos inicialmente por algunos autores ( 11, 89). Estos ribosomas tienen unos 200  $\text{\AA}$  de diámetro (163, 239). Gran parte de estos ribosomas se encuentran unidos entre sí por un filamento muy delgado que pasaría por en medio de sus dos porciones, formándose así cadenas de ribosomas, que se denominan polirribosomas ó polisomas, que se localizan preferentemente en la vecindad de las miofibrillas. El filamento que une a los ribosomas formando estas cadenas, sería posiblemente el ARN-mensajero ( 21, 239). Muchos de estos polisomas tienen una disposición helicoidal de sus elementos, (Fig. 6, 9), que fueron descritos inicialmente por WADDINGTON y PERRY (259) en el embrión de la rana, y luego por CEDERGREN y HARARY (21) y SHAFIQ (235) en corazón de ratas recién nacidas y en larvas de *Drosófila* respectivamente. Estos polisomas helicoidales son de varias decenas de ribosomas de longitud, llegando en ocasiones a tener hasta 70-75 ribosomas(2). Estos polisomas serían los que intervendrían en la síntesis de la molécula de miosina ( 3, 61 a, 89, 90, 93,94(, en cuyo caso tendrían unos 60-65 ribosomas; también podrían intervenir en la síntesis de la

actina, en cuyo caso tendrían unos 15 a 25 ribosomas (90). Otras veces, aunque raramente, estos ribosomas se encuentran formando polisomas de estructura helicoidal, pero en formas incurvadas, en cuyo caso corresponderían a la forma espiral descrita por GALAVAZZI (61 a) y también agrupados en rosetas de 4,5 ó 6 ribosomas.

A medida que el miocito va diferenciándose, disminuye la cantidad de ribosomas, y en el miocito adulto, solo los encontramos en escasa cantidad en los pequeños espacios intermiofibrilares, también en ocasiones en forma de polisomas helicoidales, lo que nos indica que también en el miocito bien diferenciado, hay, aunque escasa, síntesis de proteínas contráctiles.

HEINDENHAIN (87) ya postulaba el origen miofibrilar a partir de corpúsculos intracitoplasmáticos, que serían inframicroscópicos, reconociendo así la imposibilidad de visualizarlos con el microscopio óptico.

Las mitocondrias inicialmente son escasas y pequeñas. Al diferenciarse el mioblasto, en contra de la opinión de CARAVITA y GIBERTINI (19), observamos que

las mitocondrias aumentan considerablemente en cantidad, ya que el miocito adulto será una célula muy rica en ellas. Al mismo tiempo su forma se alarga, y en otras ocasiones adopta formas muy irregulares, incluso ramificadas. Con el desarrollo embrionario, las mitocondrias, que junto con los otros orgánoides están en los espacios intermiofibrilares, se van situando en forma de largas cadenas paralelas a las miofibrillas. También varía su riqueza en tabiques, ya que inicialmente éstos son muy escasos y posteriormente son más abundantes, siendo en ocasiones tubulares.

Aunque en raras ocasiones y en muy poca cantidad, a partir del tercer día de incubación encontramos unos gránulos redondeados, de 40 a 100  $\mu$  de diámetro, limitados por una membrana, densos al paso de los electrones, y que están algo retraídos en la periferia, dejando un anillo claro de unas 10  $\mu$ , que es a menudo atravesado periódicamente por prolongaciones radiales desde la porción densa. El grado de retracción y densidad parece ser variable según el método seguido de fijación y contraste.



(249). Dichos gránulos son parecidos a los que describen JAMIESON Y PALADE (121) en los miocitos atriales de los maíferos y que denominan "gránulos específicos", y que ya fueron someramente descritos anteriormente por KISCH (129,130) en los miocitos atriales del cobaya, denominándolos "microcuerpos" (microbodies). A nosotros, nos parece más correcta la denominación que usan SOMMER y cols. (249) y MANASEK (151, 153) de "gránulos densos", ya que no implica ninguna significación funcional, que hasta el momento es desconocida.

Respecto a su aparición, MANASEK (151, 153), no los encuentra hasta el cuarto día de incubación, en cambio nosotros ya hemos observado alguno de ellos en el tercero, aunque de forma muy aislada.

Estos gránulos densos los distinguimos en ocasiones en la vecindad (ó dentro ) de las vesículas del Aparato de Golgi, en la zona perinuclear, pero otras veces están en áreas periféricas del sarcoplasma, donde parecen estar en relación con las vesículas del Retículo Sarcoplasmático. Estos elementos también han sido encontrados en otros animales como la rana (249,252) y el ratón (961).

En nuestro material, los gránulos densos aumentan cuantitativamente con el desarrollo, pero no observamos aumento de tamaño como señalan JAMIESON y PALADE (121). Algunos autores creían que estos gránulos estarían en relación con los de lipofuscina. Durante mucho tiempo, a pesar de su similar morfología se descartó el que contuvieran catecolaminas (JAMIESON y PALADE) (121), estando ello apoyado por numerosas pruebas bioquímicas. Actualmente BENCOSME y BERGER (10), han encontrado grandes cambios en la cantidad y morfología de estos gránulos en relación con la administración de distintos compuestos simpaticomiméticos, anticolinérgicos y reserpina, señalando una posible relación entre el metabolismo de las catecolaminas y los gránulos densos.

Las células musculares, y en particular, las células cardíacas, son muy ricas en glucógeno. Durante la diferenciación hemos encontrado grandes acúmulos de glucógeno en las células musculares más indiferenciadas como señala también MANASEK (149); estos acúmulos aumentan progresivamente durante la primera mitad de la incubación disminuyendo luego ligeramente hasta

el momento del nacimiento, pero encontrándose siempre en cantidad notable, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos por CZARNECKI y CARPENTER (26) con métodos histoquímicos y con extracciones. El glucógeno se presenta en forma de partículas esféricas de 30 a 50  $\mu$  de diámetro, homogéneas y densas que corresponden a la forma elemental beta descrita por HEUSON-STLENNON y DROCHMANS (92). Estas masas de beta-glucógeno las encontramos por lo general en áreas periféricas del sarcolema entre las miofibrillas y demás organoides intracelulares, contrariamente a lo que HEUSON-STIENNON y DROCHMANS (92) observan en los mioblastos de músculo esquelético cuya localización es perinuclear.

Una peculiaridad de dichos acúmulos de glucógeno es la relación tan directa que parece existir con los depósitos de lípidos que se encuentran en su vecindad ó incluso en su interior adoptando formas estrelladas, densas a los electrones. Al mismo tiempo en los bordes de estas masas de glucógeno observamos un discreto aumento de las vesículas del retículo sarcoplasmático, lo que sería explicable según los trabajos

de COIMBRA y LEBLOND (23) que han demostrado autorradiográficamente en los hepatocitos de la rata que el retículo endoplasmático agranular juega un papel en la conversión de la glucosa en glucógeno, y que recientemente ha sido comprobado en el retículo sarcoplasmático por WANSON y DROCHMANS (262).

En muchas ocasiones, en el sarcoplasma, cerca del núcleo se evidencia el centriolo, con su estructura típica en forma de cilindro de unos 150  $\mu$  de diámetro, formado por nueve túbulos dobles orientados paralelamente al eje. Algunas veces este centriolo nos aparece en forma de diplosoma formado por dos centriolos dispuestos generalmente en ángulo recto. En ningún caso en nuestro material hemos observado cilios en relación con el centriolo como describen algunos autores en células miocárdicas. (149, 209, 215).

Durante mucho tiempo, se consideró que las células musculares en general no podían dividirse, debido a que al haber sintetizado los miofilamentos no serían ya capaces de replicar su ADN para sufrir la mito-

sis; por otra parte ello estaba apoyado por los resultados autorradiográficos de STOCKDALE y HOLTZER (244) y de OKAZAKI y HOLTZER (182, 183) obtenidos en músculo esquelético del muslo y por analogía trasladados al músculo cardíaco. Paralelamente, otros autores no observaban ninguna estructura miofibrilar en las células que estaban en mitosis, en el músculo cardíaco (226, 227, 260), sugiriendo que estas células serían células indiferenciadas y que posteriormente se diferenciarían en miocitos. En 1966 MARK y STRASSER (158) observaron con el microscopio de contraste de fase, una figura de mitosis en miocitos cultivados, que contenía una miofibrilla. Posteriormente MANASEK (150) encontró mitosis en sus células miocárdicas del embrión de pollo, que contenían miofibrillas. Mas tarde autorradiográficamente (266) se confirmó que las células musculares cardíacas bien diferenciadas, podían replicar su ADN y por tanto sufrir mitosis, observando así células musculares cardíacas hijas con marcaje intranuclear tras la inyección de timidina tritiada.

Recientemente HAY y LOW (83) han hecho un exhaustivo estudio sobre los procesos que sufren estas

células durante la mitosis.

En nuestro material hemos encontrado con relativa frecuencia, figuras de mitosis en células miocárdicas bien diferenciadas, persistiendo en ellas los grandes acúmulos de glucógeno y lípidos, y también las miofibrillas, si bien generalmente se encuentran desplazadas hacia la periferia, por ser central el aparato mitótico, pero conservando siempre su banda Z, la cual parece ser que en la anafase y telofase, desaparecería ligeramente, según los trabajos de RUMYANTSEV y cols. (cit. por HAY y LOW) y de HAY y LOW (83).

El índice de proliferación es variable con la edad del embrión, así, según JETER y CAMERON (122) en el estadio 12 es del orden del 12%, aumentando hasta el estadio 20-23, a partir de cuyo momento empieza a declinar, llegando casi hasta 0 en el momento del nacimiento, para volver entonces a aumentar ligeramente. Esta actividad proliferativa se encuentra en la periferia del ventrículo, lo que indica que su crecimiento es primariamente por aposición.

Esta persistencia de la capacidad mitó-

lica en el músculo cardíaco, en contra de lo que ocurre en el músculo esquelético, posiblemente esté en relación con la persistencia en éste último del centriólo durante todo su vida contrariamente a lo que ocurre en el músculo esquelético, es donde se encuentra en contadas ocasiones. (209,220).

Con la diferenciación también se observan alteraciones en el Aparato de Golgi, éste en la célula inmadura se encuentra muy desarrollado formado por abundantes vesículas que forman como una media luna alrededor del núcleo. Este Aparato de Golgi tan desarrollado podría estar en relación con la secreción de la "gelatina cardíaca" de la que ya hemos hablado anteriormente, y quizás también con la formación de los gránulos densos, que en muchas ocasiones se encuentran en su zona. En la célula miocárdica adulta el Aparato de Golgi se observa en contadas ocasiones, ya que está formado por escasas vesículas en la zona perinuclear.

Ya hemos dicho anteriormente que los mioblastos iniciales tienen un abundante retículo endoplasmático granular, que va desapareciendo con el desarrollo,

de forma que a los tres días de incubación ya casi no existe. En relación inversa con él, aparecen gran cantidad de vesículas, desordenadas, que pertenecen al Retículo Sarcoplasmático, que es agranular. Paulatinamente las vesículas se van localizando abundantemente por debajo del sarcolema, y generalmente en la vecindad de la línea Z, observando en ocasiones como algún túbulo la sigue, (Fig.34), como ha demostrado muy bien PURDY y cols.(1972). También se observan frecuentes vesículas alrededor de las miofibrillas a todos los niveles, lo que sugiere que el Retículo Sarcoplasmático formaría una red tubular alrededor de ellas.

Las células miocárdicas del pollo, no poseen invaginaciones de la membrana del tipo de los sistemas I, como ha sido también visto en el miocardio de la rana (241, 248,250,252) y de los ascidios (184) por tanto tiene que haber algún sistema tubular adecuado para el necesario transporte de los iones de Calcio, que posiblemente sería el mismo retículo sarcoplasmático, a través de sus conexiones en las vesículas subsarcolémicas, como

suponen SOMMER y JOHNSON (241) y JEWET y cols. (123), LEGATO y cols. (137) han encontrado depósitos de calcio en las vesículas sarcoplasmáticas perimiofibrillares, lo que confirma dicha hipótesis.

En alguna célula hemos observado una forma especial de retículo endoplasmático denominado "Annulate Lamellae" propia de células que crecen y se multiplican activamente, pero no hemos encontrado relación con otros organoides como señalan MERKOW y cols. (164).

En períodos de incubación avanzados, hemos encontrado algunas células de densidad citoplasmática muy elevada, en las que es posible distinguir algunas miofibrillas y otros orgánoides, por lo que creemos que corresponden a células musculares muertas y degeneradas como las que ha descrito MANASEK (152), y que posteriormente serían fagocitadas o expulsadas al sistema vascular (202).

Durante el desarrollo embrionario es muy raro la aparición de lisosomas, solo en alguna ocasión hemos encontrado algún cuerpo multivesicular, que quizás posteriormente daría lugar a los lisosomas (203).



El núcleo en todos los estadios es redondeado, y bastante regular, aunque parece alargarse un poco. Inicialmente puede estar algo excéntrico, pero luego enseguida se situa centralmente, estando rodeado por toda la masa de miofibrillas y sarcoplasma. La membrana nuclear, posee a intervalos regulares, numerosísimos poros nucleares, que estarían implicados en el intercambio de materiales entre el núcleo y el citoplasma. Estos poros nucleares son mucho más patentes en las células más inmaduras, ya que al parecer existe una relación directa entre el número de poros y la actividad de síntesis proteica celular (36). En algunas ocasiones en el centro del diafragma de algunos poros se encuentran unas pequeñas partículas electrodensas, que en otras localizaciones han sido interpretadas como unidades de ARN-mensajero y ARN-ribosómico que en forma espiralizada estarían en tránsito desde el núcleo al citoplasma (36,223).

El nucléolo es muy prominente, signo de una intensa síntesis proteica y en muchas ocasiones se pueden encontrar varios en un mismo núcleo.

Las células miocárdicas están limitadas por el sarcolema, que es una membrana trilaminar proteica, que está polarizada eléctricamente con una diferencia de potencial de una décima de voltio, despolarizándose al llegarle un impulso y siendo éste así transmitido al resto de la célula. En los puntos de contacto intercelular se observan en ocasiones especializaciones, para cuya denominación hemos seguido la de SOMMER y JOHNSON (241), modificada de la de FARQUHAR y PALADE (77), en "fascia occludens" (sinónimo de nexus, uniones cerradas o tight junctions ó gap junctions), "macula adherens" ó desmosoma y "fascia ó zónula adherens".

Ya hemos dicho anteriormente que en las células primitivas o inicialmente diferenciadas, los haces de filamentos parecen converger en todas direcciones hacia zonas densas del sarcolema del tipo de "fascias adherens". Con el tiempo, al crecer y ordenarse las miofibrillas, sus filamentos adquieren una dirección perpendicular al sarcolema, al mismo tiempo que estas "fascias adherens" parecen aumentar en longitud y se van plegando, como observó MUIR (172) en el conejo, dando lugar a los de-

nominados Discos intercalares ó bandas escaleriformes de los miocitos adultos, nombre último que es debido a que el encontrarse siempre a nivel de una banda Z, éstas, no están al mismo nivel en las células contiguas.

Es frecuente observar desmosomas uniendo células vecinas, generalmente en las paredes laterales de los miocitos, pero en ocasiones hemos encontrado algunos en los discos intercalares, que creemos que es debido a que al crecer éstos en longitud, el desmosoma habría sido englobado en él.

No hemos encontrado ninguna "fascia occludens" propiamente dicha, que parecen estar ausentes en este órgano como señalan SOMMER y JOHNSON (241) y MANASEK (149, 153) hecho que parecen subrayar los experimentos practicados por SPIRA (243) con ferritina, aunque en alguna zona de las flectuosidades de los discos intercalares podría ser que hubiera alguna unión más fuerte que las simples "fascias adherens", pues el espacio intersticial está muy disminuído. (Fig. 28).

Algunos autores sostienen una relación entre los desmosomas y las bandas Z (72,76,90), p



tros en nuestro material "in vivo" no hemos encontrado ningún tipo de relación entre ambas formaciones.

En ocasiones por debajo del sarcolema se pueden observar algunas vesículas de micropinocitosis, al incorporar la célula vesículas líquidas en su citoplasma.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS  
OBTENIDOS EN EL MATERIAL " IN VITRO "

El primero en cultivar músculo cardíaco fuera del organismo fue BURROWS en 1910 (17), uno de los primeros científicos en sentar las bases del cultivo de tejidos. Posteriormente CARREL (19) y CARREL y EBELING (20) mantuvieron un cultivo a partir de miocardio de embrión de pollo de 7 días, desde 1912 hasta 1946, es decir durante 34 años (175). Estos autores ya observaron que el explante, que inicialmente tenía aspecto sincitial, lo perdía, y las células, al cabo de un cierto tiempo eran fusiformes, pareciéndose a fibroblastos, por lo que las denominaron "fibroblastos cardíacos", y supusieron que los miocitos habrían degenerado y sido sustituidos por tejido conjuntivo. Mas tarde OLIVO (185, 186, 187), trabajando a partir de células del cultivo de CARREL, llegó a la conclusión de que podían ser miocitos transformados. A una conclusión parecida llegaron PARKER y FISCHER (198) y PARKER (193), comparándolas con células de tipo fibroblasto de otros tejidos de pollo.

A los pocos días de cultivados, los miocitos cardíacos contienen generalmente en su citoplasma

ma una gran cantidad de ribosomas, algunos de ellos formando polisomas helicoidales del mismo tipo que los que encontramos en la diferenciación "in vivo", y que nos indican que estas células tienen actividad sintética de miofilamentos, y que por tanto en ellas persiste la diferenciación.

Así, en los explantes a partir de corazón de embrión de 4 días observamos al microscopio óptico miofibrillas visibles al cabo de unos cuantos días, que no se encontraban en los primeros días de cultivo.

Estos filamentos que se van formando, se van asociando a las miofibrillas ya existentes; pero en muchas ocasiones parece ser que faltaría un organizador pues observamos como los filamentos gruesos, están desordenados por todo el citoplasma, entrecruzados entre sí.

En las miofibrillas que se van formando, observamos como al crecer casi nunca se ordena paralelamente entre ellas lo que creemos debido a que así como "in vivo" las células están polarizadas por sus bandas intercalares, en el cultivo esta polarización ten-

dría menos fuerza orientadora ya que las bandas intercalares con el tiempo desaparecen.

A medida que el cultivo va progresando, observamos como cada vez es más numerosa una red de filamentos delgados de diámetros comprendidos entre los de los filamentos de actina y los de miosina y que creemos corresponden a los filamentos intermedios de ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER (119) y RASH y cols. (1970), (216, 217) que son los que se encuentran de forma casi exclusiva en las células de los estadios finales. En algunas ocasiones, estos filamentos los encontramos agrupados en áreas libres de otros organoides, al igual que describen ISHIKAWA, BISCHOFF y HOLTZER (119), en los mioblastos de músculo esquelético en mitosis, bloqueados en metafase con colchicina, por lo que suponemos que estas células acabarían de sufrir una mitosis.

Cuando se tienen que formar miofibrillas muy iniciales, imbrincándose dos haces de miofilamentos a ambos lados de un cuerpo Z, observamos como estos ge-

neralmente permanecen de esta forma sin convertirse en líneas Z ni aumentando la longitud de sarcómeras.

A medida que progresa el cultivo, las miofibrillas van desapareciendo; siendo esta desaparición inversamente proporcional a la edad del embrión del que procede el explante, así según HOGUE (100), en un embrión de 2, 3 días las miofibrillas se forman y persisten visibles al microscopio óptico durante unos 28 días, y si el embrión es de 6 ó 8 días persisten durante 11 y 7 respectivamente.

Esta desaparición la creemos debida a que en el cultivo las miofibrillas sufren una desorganización y paulativamente se van desestructurando separándose en sarcómeras, transformándose sus líneas Z en cuerpos Z, densos, gruesos, y redondeados, para finalmente desaparecer y encontrar simplemente haces de filamentos aislados. Posiblemente en esta desaparición jugarían un papel fundamental los autofagosomas.

Al mismo tiempo que hay estas alteraciones en las miofibrillas, observamos variaciones en la canti-

dad de ribosomas. Éstos, inicialmente, ya hemos dicho que son muy abundantes como en toda célula que se está diferenciando, cual era en el embrión antes de ser explantado. Estos ribosomas es frecuente encontrarlos en la periferia de las miofibrillas, en forma de polisomas helicoidales, que serían los encargados de sintetizar los miofilamentos. Al cabo de un cierto tiempo, desaparecen los polisomas, permaneciendo algún tiempo más los ribosomas aislados, indicándonos, que ha cesado la síntesis de miofilamentos, ya que los ribosomas libres no serían formas activas (61 a).

Finalmente desaparecen también estos ribosomas libres. Esta progresiva desaparición de ribosomas, al igual que las miofibrillas, está en relación inversa con la edad del embrión explantado, pues vemos que persisten más en los cultivos a partir del embrión de 4 días que en el de 7.

Parece como si todas las células tuvieran una capacidad para realizar un nivel mínimo de síntesis que lógicamente sería mayor cuanto más joven fuera el

embrión, ya que la síntesis realizada hasta el momento es menor.

De esta manera, al alcanzar este nivel mínimo, los ribosomas ya no serían necesarios e irían disminuyendo en cantidad hasta su ausencia total en las células que encontramos en los estadios finales.

Las mitocondrias inicialmente son grandes y numerosas; persistiendo de esta manera mientras continúa la diferenciación, como en el material embrionario; seguidamente mientras persisten las miofibrillas no sufren modificaciones, pero al ir desapareciendo éstas, las mitocondrias disminuyen en cantidad y en tamaño y así las células de los estadios finales, poseen escasas y pequeñas mitocondrias con pocas crestas.

Los gránulos densos se encuentran mientras perdura la diferenciación, en las mismas localizaciones que en las células "in vivo", pero a medida que el cultivo progresa solo se encuentran en áreas periféricas, y van desapareciendo hasta estar ausentes en las células de los estadios finales.

En las células de las primeras fases de los

cultivos, se observan, extensos depósitos de glucógeno, en áreas periféricas del sarcolema en íntima asociación con acúmulos de lípidos, al igual que aparecen en el embrión. Con el tiempo, al cesar la diferenciación, estos depósitos de glucógeno van desapareciendo y también los acúmulos de lípidos, aunque estos últimos parecen persistir durante más tiempo.

En muchos miocitos se localiza con relativa frecuencia, al centriolo en el área perinuclear, pero no así en los miocitos transformados que encontramos en las fases finales de los cultivos.

En ningún caso hemos observado cilios en relación con el centriolo, en miocitos como describen RASH y cols. (215), pero si lo hemos encontrado en una célula de tipo fibroblasto. (Fig. 57).

Nosotros no hemos tenido ocasión de observar ninguna mitosis en nuestro material fijado de los cultivos. Ya hemos visto en el material embrionario que los miocitos diferenciados son capaces de sufrir mitosis;



en el material "in vitro" también parece ocurrir esto como han demostrado autoradiográficamente RUMERY y RIEKE (230), pero con menor frecuencia que en el embrión (124). KASTEN (124) también señala que después de sufrir la mitosis, en ocasiones las células hijas no se separarían, formándose células binucleadas por un fallo en la citocinesis.

El aparato de Golgi es muy prominente en las primeras fases de los cultivos formando una amplia media luna de cisternas alrededor del núcleo; con el tiempo disminuyen las cisternas y en los estadios finales es muy difícil localizarlas en las células.

En cuanto al retículo sarcoplasmático, mientras dura la diferenciación del miocito, observamos como se va desarrollando situándose con relativa frecuencia por debajo del sarcolema y en la periferia de las miofibrillas de forma casi constante a nivel de las líneas Z, como ocurría en la diferenciación "in vivo". Posteriormente al cesar la diferenciación e ir disminuyendo el número de miofibrillas, parece que inicialmente aumente

la cantidad de vesículas, aunque creemos que esto sería un efecto óptico al desaparecer las miofibrillas y permanecer las vesículas del retículo que las rodeaban. Al transcurrir más tiempo, en las células de los estadios finales, el retículo endoplasmático es muy escaso y está formado por unas pocas vesículas en ocasiones alargadas distribuidas desordenadamente en el citoplasma.

En estas células cultivadas es más frecuente encontrar, que en el material embrionario, lisosomas primarios y cuerpos multivesiculares. En algunas ocasiones hemos observado una vacuola limitada por una membrana lisa, conteniendo material celular y miofibrilar muy aumentado de densidad, formando así un autofagosoma igual a los que describe SCHAFER (1972) en cultivos de células miocárdicas de embrión de pollo, sometidos a radiaciones Röntgen; estos autofagosomas posiblemente estén implicados en la desaparición progresiva de los componentes intracitoplasmáticos. A medida que transcurre el tiempo de cultivo, disminuyen estos lisosomas en cantidad, no

encontrándose en los estadios finales.

El núcleo adopta formas muy irregulares en los primeros estadios, posiblemente como una reacción frente a una situación extraña, como sería el medio de cultivo; posteriormente se va haciendo ovalado.

Al principio destacan la gran cantidad de poros nucleares, de acuerdo con los trabajos de MUSCATELLO y cols. (176) que son más escasos en las fases tardías.

También se observan modificaciones nucleolares que siendo prominente y en ocasiones dobles (176) al principio, es muy pequeño en las fases finales de los cultivos.

Todos estos cambios en el núcleo nos indican que primeramente es un núcleo de una célula con gran actividad de síntesis, que se ha perdido en los estadios finales.

El sarcolema, al variar la forma celular de rectangular a fusiforme, también sufre modificaciones, pues disminuyen las zonas de contacto intercelular.

En las primeras fases del cultivo es frecuente observar abundantes desmosomas y "fascias adherens",

que crecen en longitud con la diferenciación adoptando formas muy sinuosas propias de las bandas intercalares. Al cesar la diferenciación e ir disminuyendo las áreas de contacto intercelular, también disminuyen en longitud las "fascias adherens"; así en las células de los estadios finales es raro encontrar "fascias adherens y desmosomas.

En nuestro material "in vitro" hemos encontrado en alguna ocasión una relación de continuidad entre bandas o cuerpos Z y fascias adherens como han descrito otros autores en material embrionario (72, 76). En nuestra opinión podría haber una relación estructural entre ambas formaciones como parece demostrar las extracciones con urea que realizan RASH y cols. (212, 213) con las que desaparecen los desmosomas y bandas intercalares y bandas Z, pero no los miofilamentos. Este componente podría ser fibrilar y formar condensado las "fascias adherens" y desmosomas y los cuerpos Z, que posteriormente se transformarían en líneas Z al ordenarse estos

filamentos, como señala KELLY (127).

Por debajo de la membrana es frecuente observar vesículas de micropinocitosis que son más abundantes que en el material embrionario, siendo ello quizás debido a la mayor proporción líquida existente en el espacio intersticial.

Es curioso observar que en los cultivos, aparte de algunos macrófagos también encontramos células del tipo fibroblasto que con el tiempo se transforman en células con un abundante retículo endoplasmático muy típico, formado por una secuencia de múltiples vesículas alargadas, generalmente granular, y en cuyo citoplasma se encuentran una gran cantidad de filamentos delgados del tipo de los filamentos Intermedios. Estas células son muy parecidas a las descritas por FERRANS y cols.(48) en los mixomas cardíacos, lo que sugiere que estas células podrían tener un mismo origen endotelial. Estas células las encontramos en cantidad inversamente proporcional a la edad del embrión explantado lo que ya fue señalado con microscopía óptica por MARK y STRASSER (158), siendo



más bastante raras en nuestro material obtenido de embriones de 4 días, lo que sería debido a que las células endoteliales empiezan a proliferar y penetrar en el miocardio embrionario hacia el cuarto día de incubación (153).

Hemos visto pues, que las células que encontramos en los estadios finales, son unas células fusiformes de citoplasma claro carentes de ribosomas, con pequeñas y escasas mitocondrias, sin aparato de Golgi, generalmente sin miofilamentos aunque pueden persistir haces de filamentos gruesos. Poseen escasas vesículas de retículo endoplasmático, carecen de lisosomas y de reservas energéticas y con una gran abundancia de filamentos del tipo de los filamentos intermediarios. Su núcleo es el propio de una célula con poca actividad.

Estas células proceden de los miocitos, descartando así las hipótesis iniciales de CARREL (19,20) y FISCHER (52) y otros que creían que todos los mioplasmas degeneraban y solo persistían las células conectivas, en contra de la opinión de LEVI (138, 139), LEWIS (142), y OLIVO, (185,186,187) que suponían como nosotros hemos

visto que eran células transformadas a partir de los micocitos iniciales.

A este proceso muchos autores le han denominado de desdiferenciación (185,186,187), pero nosotros no creemos correcta esta denominación ya que la célula no sufre un retroceso hacía la célula originaria pues no hay evidencia de que esta célula sea embrionaria totipotencial,(73) sino que simplemente sería una adaptación al medio llegando y permaneciendo la célula en un estado de vida vegetativa, pues desaparecen de ellas el pool de síntesis (ribosomas y Aparato de Golgi) el pool energético (mitocondrias, glucógeno y lípidos), y también el pool catabólico (lisosomas).

## CONCLUSIONES

1.- Las células miocárdicas adquieren sus miofibrillas, paulatina y progresivamente a lo largo de su diferenciación.

2.- Los miocitos iniciales estudiados por nosotros, poseen filamentos de miosina desordenados y una red extensa, que ocupa todo el sarcoplasma formada por filamentos de actina y filamentos Intermedios.

3.- Posteriormente los filamentos de miosina se agrupan en haces, al imbrincarse con los de actina, adoptando su típica estructura hexagonal.

4.- Seguidamente estos haces de miofilamentos se relacionan por uno de sus extremos con un cuerpo Z, al que se unen, formándose así una miofibrilla inicial. Estas miofibrillas iniciales acostumbran a localizarse en la periferia del sarcoplasma, por debajo del sarcolema.

5.- Se une otro haz de miofilamentos en el extremo opuesto del cuerpo Z y a continuación, éste

se estrecha y alarga dando lugar a la línea Z.

6.- Las miofibrillas crecen en longitud por unión de nuevos haces a las últimas líneas Z, y en grosor por aposición de miofilamentos en su periferia, donde son sintetizados por polirribosomas generalmente helicoidales.

7.- Los filamentos intermedios, inicialmente son muy abundantes, y al madurar los miocitos van decreciendo.

8.- Las miofibrillas, al ir creciendo en grosor, se orientan paralelamente al eje mayor celular, dejando entre sí unos estrechos espacios intermiofibrilares donde se van a situar los restantes componentes celulares.

9.- Inicialmente las mitocondrias son pequeñas y escasas; con la diferenciación aumentan considerablemente en número y tamaño colocándose entre las miofibrillas agrupadas en largas cadenas.

10.- Al tercer día de incubación, hemos encontrado ya algún gránulo denso, que con el tiempo

aumentan en cantidad, pero no en tamaño.

11.- Durante la primera mitad del tiempo de incubación, hay un aumento gradual de los depósitos de glucógeno, que disminuyen luego ligeramente hasta el momento del nacimiento, siendo a partir de entonces constantes.

12.- Estos depósitos de glucógeno, están en íntima relación con acúmulos estrellados y densos de lípidos, que también se encuentran en cantidad considerable.

13.- En muchos miocitos es fácilmente localizable el centríolo, por lo que creemos que existe en todas las células.

14.- Las células miocárdicas diferenciadas, pueden sufrir mitosis sin que por ello pierdan sus estructuras características, observándose en ellas solamente una ligera desorganización de las miofibrillas.

15.- El Aparato de Golgi está siempre situado alrededor del núcleo, siendo inicialmente muy prominente con abundantes cisternas que se reducen gradual-

mente, hasta ser pequeñas y relativamente escasas en el miocito adulto.

16.- Los miocitos, al diferenciarse, tienen una gran actividad de síntesis, indicada por la existencia de abundantes ribosomas dispersos por todo el sarcoplasma, preferentemente alrededor de las miofibrillas. En muchas ocasiones, estos ribosomas se encuentran agrupados en polisomas helicoidales de considerable longitud. Con el desarrollo embriológico, se va reduciendo la cantidad de ribosomas y así se encuentran muy pocos en los espacios intermiofibrilares de la célula diferenciada.

17.- Las células iniciales tienen abundante retículo endoplasmático rugoso, que desaparece pronto y en su lugar se encuentran gran cantidad de vesículas sarcoplasmáticas dispersas por todo el citoplasma; estas vesículas se sitúan con mayor frecuencia por debajo del sarcolema y alrededor de las miofibrillas, con cierta constancia a nivel de la línea Z.

18.- Las células musculares embrionarias en vías de diferenciación, prácticamente no poseen liso-

somas aunque sí se pueden observar cuerpos multivesiculares que podrían ser el origen de aquellos.

19.- En nuestro material todas las células tienen un núcleo único, grande y ovalado, cuya membrana posee numerosos poros nucleares. En el interior del núcleo hay uno ó dos prominentes nucléolos.

20.- Estos miocitos, al principio están separados por amplios espacios intersticiales, que se van reduciendo gradualmente, al mismo tiempo que las células que inicialmente son pequeñas y cuadradas, crecen y se alargan.

21.- En los puntos de contacto del sarcolema de dos células vecinas hay con frecuencia desmosomas y "fascias adherens", que en muchas ocasiones se localizan en ambos polos celulares. Estas condensaciones de la membrana, cuando están situadas en los dos polos forman profundas flexuosidades, y se denominan Bandas Intercalares, ó también Bandas escaleriformes, pues observándolas con el microscopio óptico forman como un peldaño al pasar de una célula a la contigua. En estas Bandas Intercalares,



se insertan los miofilamentos, primero en dirección oblicua y desordenadamente, que se va haciendo perpendicular al ir orientándose las miofibrillas paralelamente al eje celular. Esta inserción se realiza en el nivel que correspondería a una línea Z, por lo que de esta manera las células adoptan un aspecto sincitial, pareciendo que las miofibrillas pasan de una célula a la siguiente a través de la banda intercalar.

22.- En algunos casos hemos encontrado una evidente relación entre unas "fascias adherens" y los cuerpos Z, que suponemos debida a un mismo o parecido componente fibrilar estructural.

23.- Al cultivar el miocardio, los miocitos van dejando entre sí amplios espacios entersticiales, haciéndose fusiformes y desapareciendo así progresivamente las Bandas Intercalares.

24.- Inicialmente los miocitos cultivados continúan la diferenciación durante un cierto tiempo, que es mayor cuanto más joven es el embrión explantado.

25.- Al cesar la diferenciación, hay una reducción progresiva de ribosomas, mitocondrias, miofibri-

llas, gránulos densos, Aparato de Golgi, retículo sarcoplasmático, y de los depósitos de glucógeno y lípidos, de modo que en las células de los estadíos finales no hay ribosomas, miofibrillas, gránulos densos, Aparato de Golgi, ni tampoco depósitos de glucógeno y lípidos, encontrándose solamente algunas pequeñas mitocondrias y unas pocas vesículas de retículo endoplasmático liso. Simultáneamente aparecen mayor cantidad de filamentos intermedios que aumentan gradualmente.

26.- También se observan importantes modificaciones en el núcleo, que de tener una morfología propia de una célula con gran actividad, puede perder el nucleólo a la vez que disminuyen la cantidad de poros nucleares.

27.- En todos los estadíos de los cultivos es frecuente encontrar cuerpos multivesiculares, lisosomas y autofagosomas que jugarían un papel importante en la reducción de los componentes intracelulares.

28.- Nosotros creemos que no es correcta la denominación de "Desdiferenciación" para este proceso de transformación de las células miocárdicas en el culti-

vo, pues no hay un retroceso a una célula embrionaria anterior, sino que suponemos que es una adaptación al medio de cultivo, adoptando la célula un nivel funcional vegetativo.

BIBLIOGRAFIA



- 1.- ALLEN.E.R.: Development and organization of sarcomeres in chick striated muscle. Anat.Rec.172:261 .1972
  - 2.- ALLEN.E.R.y PEPE.F.A.: Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo. Amer.J.Anat.116:115-123. 1965
  - 3.- ALLEN.E.R.y TERRENCE.C.F.: Immunochemical and ultrastructural studies of myosin synthesis. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 60:1209-1215. 1968
  - 4.- AUBER.J.: La myofibrillogenèse du muscle striée.II. Vertébrés. J.Microscopie.8:367-390. 1969
  - 5.- BARRY.A.: cit. Romanoff. Anat.Rec.102:289-298. 1948
  - 6.- BASKIN.R.J.y DEAMER.D.W.: Comparative ultrastructure and calcium transport in heart and skeletal muscle microsomes. J.Cell.Biol.43:610-617. 1969
  - 7.- BAUD.G.A.y HAENNI.A.: cit. Romanoff. Compt.rend.soc.biol.Paris. 146:1533-1534. 1952
  - 8.- BELLAIRS.R.: cit. DeHaan (1965). Studies on the development of the foregut in the chick blastoderm. J.Embryol.Exptl.Morphol. 1:369-385. 1953
- BENDALL.J.R.: cit. Gergely (1969). Effect of the "Marsh Factor" on the shortening of muscle fibre models in the

presence of adenosine triphosphate. Nature.(London) 170:  
1058. 1951

10.- BENCOSME.S.A.y BERGER.J.M.: Specific Granules in ma  
mmalian and non-mammalian vertebrate cardiocytes. En:  
Meth.Achievm.exp.Path. vol.5,p.173-213. (ed. por BAJUSZ,  
BOSTON,MASS y JASMIN) Ed.Karger. Basel. 1971

11.- BERGMAN.R.A.: Observations on the morphogenesis of  
rat skeletal muscle. Bull.the Johns Hopkins Hosp. 110:  
187-201. 1962

12.- BISCHOFF.R.y HOLTZER.H.: Mitosis and the process of  
differentiation of myogenic cells "in vitro". J.Cell.Bi-  
ol. 41:188-200. 1969

13.- BLANDAU.R.J., RUMERY.R.E.y HAYASHI.R.A.: Observati-  
ons on cultured chick myocardial cells. Anat.Rec.145:371  
(abst). 1963

14.- BREEMEN.V.L.van.: Myofibril development observed  
with the electron microscope. Anat.Rec.113:179-196. 1952

15.- BREMER.J.L.: The presence and influence of spiral  
streams in the heart of the chick embryo. Am.J.Anat. 49:  
409-440. 1932

16.- BRIGGS.F.N.: Chemical identification of the soluble  
muscle-relaxing factor: an enzymic probe. cit. Gergely

(1969). Biochim.Biophys.Acta. 69:177. 1963

17.- BURROWS.M.T.: The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body. J.Amer.med.Ass. 55:2057. 1910. cit. Murray (1969).

18.- CARAVITA.S. y GIBERTINI.G.: Osservazioni sull'ultrastruttura del cuore di embrione di pollo durante la miogenesi. Arch.Ital.Anat.e Embriol 71:43-68. 1966

19.- CARREL.A.: Present condition of a strain of connective tissue twenty-eight months old. J.Exp.Med. 20:1. 1914 . cit. Murray (1969)

20.- CARREL.A. y EBELING.A.H.: Au sujet d'une famille de fibroblastes se multipliant "in vitro" depuis douze ans. C.R.Soc.Biol.Paris. 90:410. 1924. cit.Murray(1969)

21.- CEDERGREN.B. y HARARY.I.: In vitro studies on single beating rat heart cells.VI-Electron microscopic studies of single cells. J.Ultras.Res.11:428-442. 1964

22.- CEDERGREN.B. y HARARY.I.: In vitro studies on single beating rat heart cells. VII-Ultrastructure of the beating cell layer. J.Ultras.Res. 11:443-454. 1964

23.- COIMBRA.Ay LEBLOND.C.P.: Sites of glycogen synthesis in rat liver cells as shown by electron microscope radio

autography after administration of glucose- $H^3$ . J.Cell.  
Biol. 30:151-175. 1966

24.- CONSTANTINI.L.L.,FRANZINI-ARMSTRONG.C.y PODOLSKY.R:  
Localization of calcium accumulationg structures in strii  
ated muscle fibres. Science 147:158-159. 1965

25.- CRACIUM.E.C.: La culture des tissues en Biologie Exp  
périmentale. Masson Et Co. Ed. Paris 1931

26.- CZARNECKI.C.M.y CARPENTER.A.M.: Observations on the  
histochemical and chemical distribution of glycogen in  
the chick heart. Anat.Rec. 166:161-166. 1970

27.- DALTON.A.J.: cit. Pease (1964). Anat.Rec.121:281.  
1955

28.- DAVIES.R.E.: A molecular theory of muscle contract  
tion of calcium-dependent contractions with hydrogen bond  
formation plus ATP-dependent extension of part of the muo  
sin-actin cross bridges. cit.Gergely (1969) Nature(Lon)  
199:1068. 1963

29.- DAVIS.C.L.: cit. Romanoff (1960). Anat.Rec. 27:201-  
-202. 1924

30.- DeHAAN.R.L.: Development of pacemaker tissue in the  
embryonic heart. cit. Genis Galvez (1970). Ann.N.Y.Acad.  
Sci. 1965

- 31.- DeHAAN.R.L.: Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. Develop.Biol. 16:216-249. 1967
- 32.- DeHAAN.R.L. y URSPRUNG.H.: Organogenesis . Holt.Rin. and Winston Inc.New York 1965
- 33.-DESSOUKY.D.A.y HIBBS.R.G.: An electron microscope study of the somatic muscle of the chick embryo. Am.J. Anat. 116:523-565. 1965
- 34.- DOUARIN.G.Le.: Electron microscopic study of the structure of precardiac mesenchyme of cells of the heart tube prior to the stage of formation of myofibrils. C.R. Acad.Sci.(paris) 260:973-976. 1965
- 35.- DUESBERG.J.: Les chondriosomes dans les cellules embryonnaires du poulet et leur rôle dans la genèse des myofibrilles. Arch.Zellforsch.4:602-671. 1910
- 36.- DuPRAW.J.C.: Cell and molecular Biology. Acad.Press New York 1969
- 37.- EATON.B.L.y PEPE.F.A.: M band protein.Two components isolated from chicken breast muscle. J.Cell.Biol.55:681-695. 1972
- 38.- EBASHI.S.: cit. Gergely (1969) Ann.Intern Med. 67: 636. 1967

- 39.- EBASHI.S.y ENDO.M.: cit. Lowey (1972) Prog.Biophys.  
Mol.Biol. 18:123. 1968
- 40.- EBASHI.S.y ENDO.M.: Calcium ion and muscle contrac-  
tion. cit Gergely (1969) Prog.Biophys.Mol.Biol. 19:321  
1969
- 41.- EBASHI.S.y LIPMANN.F.: Adenosine triphosphatase-lin-  
ked concentration of calcium ions in a particular frac-  
tion of rabbit muscle. cit.Sommer y cols (1969). J.Cell  
Biol. 14:389-400. 1962
- 42.- EBERT.J.D.: Analysis of the synthesis and distribu-  
tion of the contractile protein, myosin, in the develop-  
ment of the heart. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.39:333-344. 1953
- 43.- EBERT.J.D.: The molecular basis of the first heart  
beats. cit.Genis (1970).Ann.N.Y.Acad.Sci.7:968-985.1955
- 44.- ELLIOT.G.F.,LOWY.J. y MILLMAN.B.M.: Low-angle X-ray  
diffraction studies of living striated muscle during con-  
traction. cit.Gergely (1969) J.Mol.Biol.25:31. 1967
- 45.- ELLIOT.G.F.,ROME,E.M.y SPENCER.M.: A type of con-  
traction hypothesis applicable to all muscles. Nature  
226:417-420. 1970
- 46.- EZERMAN.E.B.y ISHIKAWA.H.: Differentiation of the



- sarcoplasmic reticulum and T system in developing chick skeletal muscle "in vitro". J.Cell.Biol.35:405-420.1967
- 47.- FAWCETT.D.W.y McNUTT.N.S.: Ultrastructure of myocardium. J.Cell Biol.42:1-23. 1969
- 48.- FERRANS.V.F.y ROBERTS.W.C.: Structural features of cardiac myxomas. Human.Path.4:111-146. 1973
- 49.- FERRIS.W.: Electron microscope observations of the histogenesis of striated muscle. Anat.Rec.133:275. 1959
- 50.- FIRKET.H.: Etude de l'ultrastructure de bourgeons musculaires en régénération pendant la myogenèse. J.de Microscopie 2:638-649. 1963
- 51.- FIRKET.H.: Ultrastructural aspects of myofibrils formation in cultured skeletal muscle. Z.Zellforsch.79: 313-327. 1967
- 52.- FISCHER.A.: The interaction of two fragments of pulsating heart tissue. cit.Cracium (1931) J.Exp.Med. 39: 577: 1924
- 53.- FISCHMAN.D.A.: An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle. J. Cell Biol. 32:557-575. 1967
- 54.- FISCHMAN.D.A.,SHIMADA.Y. y MOSCONA.A.A.: Myogenesis

" in vitro": an electron microscope study. J.Cell Biol.  
35:39A. 1967

55.- FISCHMAN.D.A.: The synthesis and assembly of myofibrils in embryonic muscle. Cap. 7 en: Current topics in (embryonic) developmental Biology. (ed. por Moscona y Monroy) Vol.5: 235-280. 1970

57.- FORBES.M.S. y SPERELAKIS.N.:  $(Na^+, K^+)$ -ATPase activity in tubular system of mouse cardiac and skeletal muscles  
Z.Zellforsch.und Mik.Anat 134:1-12. 1972

58.- FRANZINI-ARMSTRONG.C.: Fine structure of sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in muscle fibers. Fed.Proc. 23:887-895. 1964

59.- FRANZINI-ARMSTRONG.C. y PORTER.K.R.: The Z-disc of skeletal muscle. Z.Zellforsch.Mik.Anat. 61:661-672.1964

60.- FRANZINI-ARMSTRONG.C. y PORTER.K.R.: Sarcolemmal invaginations and the T-system in fish skeletal muscle. Nature 202:355-357. 1964

61.- GAETGENS.E., BARANNY.K.y BAILING.G.: Studies on the low molecular weight protein components in rabbit skeletal myosin. cit.Gergely (1969). Arch.Biochem.Biophys.  
123:82. 1968

61 a.- GALAVAZAZZI.G.: Identification of helical polyri-

- bosomes in sections of skeletal muscle. *Z. Zellf.* 121:531. 1971
- 62.- GARAMYOLGYI.N.: cit. Fischman (1970) *J. Ultras. Res.*  
13: 425. 1965
- 63.- GASSER.E.: cit. Romanoff (1960) *Arch. mikroskop. Anat  
und Entwickl.* 14:459-469. 1967
- 64.- GENIS GALVEZ.J.M.: *Biologia del desarrollo*. Edito.  
Espaxs. 1970.
- 65.- GERGELY.J.: *Biochemical aspects of muscular structure  
and function*. Cap. 5 en: *Disorders of voluntary muscle*.  
(ed. por Walton). J.&A.Churchill Ltd. 1969
- 66.- GESSNER.I.H. y BOSTROM.H.: *In vitro studies on S<sup>35</sup>-  
sulfate incorporation into the acid mucopolysaccharides  
of chick embryos cardiac jelly*. cit. Manasek (1968). *J.  
Exp. Zool.* 160:283-290. 1965
- 67.- GOLDSPIK.G.: *The proliferation of myofibrils during  
muscle fibre growth*. *J. Cell Sci.* 6:593-603. 1970
- 68.- GOLL.D.E.: cit. Fischman (1970). *Biochim. Biophys.  
Acta* 175:174-194. 1969
- 69.- GOLL.D.E., SUZUKI.A. y SINGH.I.: cit. Lowey (1972) *Bio-  
phys. Soc. Annu. Meet. Abstr.* 107a. 1971
- 70.- GOSS.C.M.: cit. Orts LLorca Y Gonzalez de Santander

- (1969). First Contractions of the heart without cytological differentiation. *Anat.Rec.* 76:19-27. 1940
- 71.- GRAPER.L.: cit. Romanoff (1960) *Arch.Entwicklungs.Organ.* 24:375-410 . 1907
- 72.- GRIMLEY.P.M. y EDWARDS.G.A.: The ultrastructure of cardiac desmosomes in the toad and their relationship to the intercalated disc. *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 8:306-318. 1960
- 73.- GROBSTEIN.C.: en: *The Cell* ( ed. Brachet y Mirsky) Cap. 2:437-496. Academic Press New York. 1959
- 74.- HABA.G.de La., AMUNDSEN.R.: The contribution of Embryo extract to myogenesis of avian striated muscle "in vitro". *Proc.Nat,Acad.Sci.U.S.* 69:1131-1135. 1972
- 75.- HABA.G.de La., COOPER.G.W.y ELTING.V.: Myogenesis of striated muscle in vitro: hormone and serum requirements for the development of glycogen synthetase in myotubes. *J.Cell(Biol)Physiol.* 72:21-28. 1968
- 76.- HAGOPIAN.M.y SPIRO.D.: Derivation of the Z-line in the embryonic chick heart. *J.Cell Biol.* 44:683-687. 1970
- 77.- HAM.A.W.: Tejido muscular. Cap 20:438-466, en: *Tratado de Histologia.* Ed. Interam. 5ª ed. 1967.

- 78.- HAMBURGER.V. y HAMILTON.H.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J.Morphol. 58:49-92. 1951
- 80.- HANKS.J.H.y WALLACE.R.C.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc.Soc.Exper.Biol.&Med. 71: 196. 1949
- 81.- HANSON.J.y LOWY.J.: The structure of F-actin and of actin elements isolated from muscle.J.Mol.Biol.6:46.1963
- HASSELBACH.W.: Relaxation and the sarcotubular calcium pump. cit.Sommer y cols (1969). Fed.Proc.23:909. 1964
- 83.- HAY.D.A. y LOW.F.N.: The fine structure of progressive stages of myocardial mitosis in chick embryos. Am. J.Anat. 134:175-202. 1972
- 84.- HAY.E.D.: Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating Amblystoma limbs. Develop.Biol. 1:555-558. 1959
- 85.- HAY.E.D.: Fine structure of differentiating muscle in developing myotomes of "Amblystoma opacum". Anat.Rec. 139:236-243. 1961
- 86.- HAY.E.D.: The fine structure of differentiating mus

- cle in Salamander tail. Z.Zellforsch.59:6-34. 1963
- HEINDENHAIN.M.: Über die Struktur des menschlichen Herzmuskels. cit.Auber (1969). Anat.Anz. 20:33-78. 1901
- 88.- HERRMANN.H.,HEYWOOD.S.M. y MARCHOK.A.C.: Reconstruction of muscle development as a consequence of macromolecular synthesis. Cap. 6:181-234. En: Current topics in developmental Biology. (Ed. Moscona y Monroy) Vol.5.1970
- 89.- HEUSON-STIENNON.J.A.: Intervention des polysomes dans la synthèse des myofilaments du muscle embryonnaire de rat. J.Microsc. 3:229-232. 1964
- 90.- HEUSON-STIENNON.J.A.: Morphogenèse de la cellule musculaire striée au microscope électronique.I.Estructures fibrillaires. J.Microscop. 4:657-678. 1965
- 91.- Heuson-STIENNON.J.A.: Synthèse et accumulation du glycogène particulaire dans la cellule musculaire en développement. J.Microscop.5:56a. 1966
- 92.- HEUSON-STIENNON.J.A. y DROCHMANS.P.: Morphogenèse de la cellule musculaire striée, étudiée au microscope électronique. II.Localisation et structure du glycogène J.Microscop. 6:639-656. 1967
- 93.- HEYWOOD.S.M.,DOWBEN.R.M. y RICH.A.: The identifica-

tion of polyribosomes synthesizing myosin. Proc.nat.Acad.  
A.Sci.U.S. 57:1002. 1967

94.- HEYWOOD.S.M. y RICH.A.: In vitro synthesis of native myosin, actin, and tropomyosin from embryonic chick polyribosomes. Proc.Nat.Acad Sci.U.S. 59:590-597. 1968

95.- HIBBS.R.: Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryo. Am.J.Anat.99:17-35. 1956

96.- HIBBS.R.G.y FERRANS.V.J.- An ultrastructural and histochemical study of rat atrial myocardium. Am.J.Anat.  
124:251-262. 1969

97.- HIKIDA.R.S.: The structure of the sarcotubular System in avian muscle. Am.J.Anat.134:481. 1972

98.- HILFER.S.R.,SEARLS.R.L. y FONTE.V.G.: An ultrastructural study of early myogenesis in the chick wing bud. Develop.Biol. 30:374-391. 1973

99.- HIS.W.: cit. Romanoff (1960). En: Die Erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. (ed.Vogel) . 1868.

100.- HOGUE.M.J.: Studies of heart muscle in tissue culture. Anat.Rec. 67:521-535. 1937

101.- HOLTZER.H.: Some further uses of antibodies for analyzing the development of muscle,Exp.Cell.Res. (Supl)

7:234-243. 1959

102.- HOLTZER.H.: Myogenesis. En: Cell differentiation (ed.Schjeide,De Vellis) p:476-503. Van Nostrand Rein. Co. 1970

103.- HOLTZER.H.,ABBOTT.J. y CAVANAUGH.M.W.: Some properties of embryonic cardiac myoblasts. Exp.Cell Res.16:595 (abst). 1959

104,- HOLTZER.H.,MARSHALL.J.M.Jr. y FINCK.H.: An analysis of myogenesis by the use of fluorescent antimyosin. J.Biophys.Biochem.Cytol. 3:705-727. 1957

105.- HOLTZER.H. y SANGER.J.W.: Myogenesis: Old views rethought. En: Research in muscle development and the muscle spindle. (ed:Banquer,Przybylski, Van der Meulen, y Victor). p.122-133. Excerpt.Med. Holanda. 1972

106.- HUXLEY.A.F.: Muscle structure and theories of contraction. Progr.Biophys. 7:255. 1957

107.- Huxley.A.F. y NIEDERGERKE.R.: Structural changes in muscle during contraction: interference microscopy of living muscle fibers. Nature. 173:971. 1954

108.- HUXLEY.A.F. y TAYLOR.R.E.: Local activation of striu

ated muscle fibers. cit. Gergely (1969). J.Physiol.144:  
426. 1958

109.- HUXLEY.A.F.,TAYLOR.R.E. y STRAUB.R.W.: Local actiu  
vation and interfibrillar structures in striated muscle.  
cit. Price (1969). J.Physiol.143:40. 1958

110.- HUXLEY.H.E.: The double array of filaments in cross  
striated muscle. J.Biophys.Biochem.Cytol.3:631-648. 1957

112.- HUXLEY.H.E.: Electron microscope studies on the  
structure of natural and synthetic proteins filaments  
from striated muscle. J.Mol.Biol.7:281. 1963

113.- HUXLEY.H.E.: El mecanismo de la contraccion muscu-  
lar. Cap. 34, p.399-409. En: La celula viva. Selec. de  
Scientific Am. Ed. Blume. 2<sup>a</sup>ed. 1965

114.- HUXLEY.H.E. y BROWN.W.: The low angle X-ray diagram  
of vertebrate striated muscle and its behavior during c  
contraction and rigor. cit. Huxley.H.E.(1965). J.Mol.  
Biol. 30:383. 1965

115.- HUXLEY.H.E. y HANSON.J.: Changes in the cross-striu  
ations of muscle during contraction and stretch and their  
structural interpretation. Nature. 173:973. 1954

- 116.- IKEMOTO.N.,SRETER.F.A. y GERGELY.J.: Localization of Ca-uptake and ATPase activity in fragments of sarco-plasmic reticulum. cit. Gergely (1969). Fed. Proc. 25: 465. 1966
- 117,- IMAI.S. y TAKEDA.K.: Calcium and contraction of heart and smooth muscle. cit. Lowey (1972). Nature 213: 1044. 1967
- 118.- ISHIKAWA.H.: Formation of elaborate T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to T-system formation. J.Cell Biol. 38:51-73. 1968
- 119.- ISHIKAWA.H.,BISCHOFF.R. y HOLTZER.H.: Mitosis and Intermediate-sized fialments in developing skeletal muscle. J.Cell Biol. 38:538-558. 1968
- 120.- ISHIKAWA.H.,BISCHOFF.R. y HOLTZER.H.: Formation of arrowhead complexes with meromyosin in a variety of cell types. J.Cell Biol. 43:312-328. 1969
- 121.- JAMIESON.J.D. y PALADE.G.E.: Specific granules in atrial muscle cells. J.Cell Biol. 23:151-172. 1964
- 122.- JETER.J.R.: Relationship of cell proliferation and cytodifferentiation in embryonic chick tissues. Anat.Rec. 116:325 (abst). 1970

- 123.- JEWET.P.H.,LEONARD.S.D. y SOMMER.J.R.: Chicken car-  
diac muscle: its elusive extended junctional sarcoplasmic  
reticulum and sarcoplasmic reticulum fenestrations. J.Cell  
Biol. 56:595-600. 1973
- 124.- KASTEN.F.H.: Rat myocardial cells "in vitro": Mi-  
tosis and differentiated properties. In Vitro 8:128-149.  
1972
- 125.- KAY.D.: Techniques for electron microscopy. Black-  
well Sci.Pub. Oxford. 1967
- 126.- KELLY.D.E.: Myofibrillogenesis and Z-band differen-  
tiation. Anat.Rec. 163:403-426. 1969
- 127.- KELLY.D.E. y CAHILL.M.A.: Filaments and matrix com-  
ponents of skeletal muscle Z-disks. Anat.Rec. 172:623-  
-642. 1972
- 128.- KENDRICK-JONES.J.: cit. Fischman (1970). Science  
163:1196-1198. 1969
- 129.- KISCH.B.: Electron microscopy of the atrium of he-  
art guinea pig. Exp.Med.Surg. 14:99-112. 1956
- 130.- KISCH.B.: A significant electron microscopic diffe-  
rence between the atria and the ventricles of the mamma-  
lian heart. Exp.Med.Surg. 21:193-221. 1963



- 131.- KNAPPEIS.G.E. y CARLSEN.F.: The ultrastructure of the Z-disc in skeletal muscle. J.Cell Biol. 13:323. 1962
- 132.- KNAPPEIS.G.E. y CARLSEN.F.: cit. Fischman (1970) J.Cell Biol. 38:202. 1968
- 133.- KOLLIKER.: cit. Ham. (1967). 1888
- 134.- KONIGSBERG.I.R.: Some aspects of myogenesis "in vitro". Circulation 24:447-457. 1961
- 135.- KONIGSBERG.I.R.: Clonal analysis of myogenesis. Science. 140:1273. 1963
- KONIGSBERG.I.R.: Aspects of Cytodifferentiation of skeletal muscle. Cap. 14 en: Organogenesis (ed. DeHaan y Ursprung) . 1965
- 137.- LEGATO.M.J. y LANGER.G.A.: The subcelular localization of calcium ion in mammalian myocardium. J.Cell Biol. 41:401-423. 1969
- 138.- LEVI.G.: La reale esistenza delle miofibrille nell cuore dell'embrione di pollo. Osservazioni sul cuore vivente e su elementi coltivati "in vitro". Cit. Murray (1969). Acad.naz.Linoei.Rome 31:425. 1912
- 139.- Levi.G.: Explantation, besonders die Struktur und

- die biologischen Eigenschaften der in vitro gezüchteten Zellen und Gewebe. *Ergebn.Anat.und Entwickl.* 31:125-706.1934
- 140.- LEVI.G.: *Trattato di Istologia*. Vol.II p.631. cit. Murray (1969). *Unione Tipographica.Torino*. 1954
- 141.- LEVINTOW.L. y EAGLE.H.: *Biochemistry of cultured mammalian cells*. *Ann.Rev.Biochem.* 30:605. 1961
- 142.- LEWIS.W.H.: *Cultivation of embryonic heart muscle*. cit Murray (1969). *Carneg.Inst.Wash.Contrib.Embryol.* 90:18,1.1926
- 143.- LOWEY.S.: *Protein interactions in the myofibril*. En: *Polimerization in Biological Systems*. *Ciba Found.Symp.* 7 p.217-243. *Elsev.Excerpt.Med. Holland*. 1972
- 144.- LOWEY.S. y HARRISON.R.G.- datos no publicados. cit. Lowey (1972). 1972
- 145.- LOWEY.S., HARRISON.R.G. y MARGOSSIAN.S.S.: datos no publicados. cit. Lowey (1972). 1972
- 146.- LOWEY.S. y LUCK.S.: cit. Lowey (1972). *Biochemistry* 8:3195. 1969
- 147.- LOWEY.S. y RISBY.D.: cit. Lowey (1972). *Nature (Lon)* 234:81. 1971
- 148.- LOWY.J. y HANSON.J.: cit. *Fischman (1970)*. *Physiol. Rev.* 42:34 Suppl.5:418. 1962

- 149.- MANASEK.F.J.: A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. J.Morphol. 125:329-366. 1968
- 150.- MANASEK.F.J.: Mitosis in developing cardiac muscle. J.Cell Biol. 37:191-196. 1968
- 151.- MANASEK.F,J.: The appearance of granules in the Golgi complex of embryonic cardiac myocytes. J.Cel Biol.43: 605-610. 1969
- 152.- MANASEK.F.J.: Myocardial cell death in the embryonic chick ventricle. J.Embryol. exp.Morphol. 21:271-284. 1969
- 153.- MANASEK.F.J.: Histogenesis of the embryonic myocardium. Am.J.Cardiol. 25:149-167. 1970
- 154.- MANASEK.F.J.: Sulfated extracellular matrix production in early embryos. Anat.Rec.166:343 (abst). 1970
- 155.- MANASEK.F.J.,BURNSIDE.M.B. y WATERMAN.R.E.: Myocardial cell shape change as a mechanism of embryonic heart looping. Develop. Biol. 29:349-371. 1972
- 157.- MARGOSSIAN.S.S.: cit. Lowey (1972). Fed.Proc. 31:866 (abst). 1972
- 158.- MARK.G.E. y STRASSER.F.F.: Pacemaker activity and mi

- tosis in cultures of newborn rat heart ventricle cells.  
Exptl.Cell Res. 44:217. 1966
- 159.- MARSH.B.B.: A factor modifying muscle syneresis. cit.  
Gergely (1969). Nature 167:1065. 1951
- 161.- MARUYAMA.K.: A new protein factor hindering network  
formation of F-actin in solution. cit. Fischman (1970)  
Biochim.Biophys.Acta. 94:208-225. 1965
- 162.- MASAKI.K.: cit. Fischman (1970). J. Biochem (tokyo)  
1968
- 163.- MATTER.A. y PERRELET.A.: Polyribosomes of cultivated  
heart muscle as studied with the electron microscope gonio  
meter. J. Microscopie. 9:1041-1048. 1970
- 164.- MERKOW.L. y LEIGHTON.J.: Increased numbers of annulae  
te lamellae in myocardium of chick embryos incubated at abn  
normal temperatures. J.Cell Biol. 28:127-137. 1966
- 165.- MEYER.H. y QUEIROGA.L.T.: An electron microscope stud  
y of embryonic heart muscle cells grown in tissue culture.  
J.Biophys.Biochem.Cytol. 5:169-171. 1959
- 166.- MEYER.H. y QUEIROGA.L.T.: En: The specialized tissues  
of the heart. (ed. De Carvalho, De Mello y Hoffman).p.76  
Am.Els.Pub.Co.Inc. cit. Murray ( 1969). 1962

- 167.- MOORE .D.H. y RUSKA.H.: Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. J.Biophys.Biochem.Cytol. 3:261-267. 1957
- 168.- MOORE.P.B., HUXLEY.H.E. y DE ROSIER.D.J.: cit. Lowy<sup>e</sup> (1972). J.Mol.Biol. 50:279. 1970
- 169.- MORKIN.E.: Postnatal muscle fiber assembly: localization of newly synthesised myofibrillar proteins. Science. 167:1499-1501. 1970
- 170.- MOSCONA.A.A.: Cytoplasmic granules in myogenic cells. Exptl. Cell Res. 9:377-384. 1955
- 171.- MUELLER.H. y PERRY.S.V.: The degradation of heavy meromyosin by trypsin. cit. Gergely (1969). Biochem.J. 85: 431. 1962
- 172.- MUIR.A.R.: AN electron microscope study of the embryology of the intercalated disc in the heart of the rabbit. J.Biophys.Biochem.Cytol.3:193-202. 1957
- 173.- MUIR.A.R.: Further observations on the cellular structure of cardiac muscle. J.Anat. 99:27-46. 1965
- 174.- MURILLO. : cit por Orts Ulorca (1970). 1963
- 175.- MURRAY.M.R.: Cap. 8-II. p.320-372. En: Cells and Tissues in culture (ed.Willmer). 1969

- 176.- MUSCATELLO.V., PASQUALI-RONCHETTE.I. y BARASA.A.: An electron microscope study of myoblasts from chick embryo heart cultured in vitro. J.Ultrastruc. Res.23:44-59.1968
- 177.- NEWSTEAD.J.D.: Filaments in renal parenchymal and interstitial cells. J.Ultras.Res.34:316-328. 1971
- 178.- NIEDERGERKE.R.: Movements of calcium in frog heart ventricles at rest and during contractures. cit. Sommer y cols.(1969). J.Physiol.(Lon) 167:515-550. 1963
- 179.- OBINATA.T., YAMAMOTO.M. y MARUYAMA.K.: The identification of randomly formed thin filaments in differentiating muscle cells of the chick embryo.Develop.Biol.14:192. 1966
- 180.- OGAWA.Y.: Synthesis of skeletal muscle proteins in early embryos and regenerating tissue of chick and "triturus". Exptl.Cell.Res. 26:269-274. 1962
- 181.- OHTSUKI.I., MASAKI.T., NONOMURA.Y. y EBASHI.S.: Periodic distribution of troponin along the thin filament. J.Biochem. 61:817. cit. Gergely (1969). 1967
- 182.- OKAZAKI.K.y HOLTZER.H.: An analysis of myogenesis using fluorescein-labeled antimyosin. J.Histochem.Cytochem. 13: 726-739. 1965

- 183.- OKAZAKI.K. y HOLTZER.H.: Myogenesis: fusion, myosin synthesis and the mitotic cycle. Proc.Nat.Acad. Sci.U.S. 56:1484-1490.1966
- 184.- OLIPHANT.L.W. y CLONEY.R.A.: The ascidian Myocardium: sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling. Z.Zellforsch. 129:395-412. 1972
- 185.- OLIVO.O.M.: Sulle modificazioni strutturali e funzionali del miocardio di pollo coltivato "in vitro". Arch. exp.Zellforsch. 8:250. cit. Murray (1969). 1928.
- 186.- OLIVO.O.M.: cit. Romanoff ( 1960). Boll.Soc. Biol. Sper. 3:18-20. 1928 a.
- 187.- OLIVO.O.M.: cit. Levi (1954). Compot.Rend.Assoc.Anat. 23:357-375. 1928
- 188.- ORTS-LLORCA.F.: Influence of the endoderm on heart differentiation during the early stages of development of the chicken embryo. Arch.Entwicklungs. Arch 154:533-551. 1963
- 189.- ORTS LLORCA.F.: cit.Orts Llorca (1970). 1968
- 190.- ORTS LLORCA.F.: Desarrollo del corazon . Cap. 17 . p.293-318. En:Biologia del desarrollo .(ed.Genis Galvez). 1970

- 191.- ORTS LLORCA.F. y GOZALEZ DE SANTANDER.R.: Estudio electromicroscópico de la primera aparición y desarrollo de los miofilamentos cardíacos (miofibrilogenesis) en el embrión de pollo. Rev.Esp.de Cardiología.4:537-568. 1969
- 192.- ORTS LLORCA.F. y JIMENEZ COLLADO.: cit. Orts Llorca (1970). 1967
- 193.- ORTS LLORCA.F. y RUANO GIL.D.: cit. Orts Llorca (1970) 1967. p.302. 1967
- 195.- PARKER.C.J.Jr. y GERGELY.J.: Soluble relaxing factor from muscle. cit. Gergely (1969). J.Biol.Chem.235:3449.1960
- 196.- PARKER.R.C.: The races that constitute the group of common fibroblasts.III Differences determined by origin of explant and age of donor. cit.Murray (1969). J.exp. Med. 58:401. 1933
- 197.- PARKER.R.C.: Métodos de cultivo de los tejidos y las celulas. Ed.Atika.S.A. Madrid. 1967
- 198.- PARKER.R.C. y FISCHER.A.: Classification of "fibroblasts" according to their physiological properties. Proc. Soc.exp.Biol.N.Y. 26:580. cit,Murray (1969). 1929
- 199.- PATTEN.B.M. y KRAMER.T.C.: The initiation of contracu

tion in the embryonic chick heart. Am.J.Anat.53:349-375.  
1933

200.- PEASE.D.C.: Histological Techniques for electron microscopy. Acad.Press. New York. 2ª ed. 1964

201.- PEPE.F.: Some aspects of the structural organization of the myofibril as revealed by antibody-staining methods. J.Cell Biol. 28:505-525. 1966

202.- PEXIEDER.T.: The tissue dynamics of heart morphogenesis .I.The phenomena of cell death.A.Identification and morphology. Z.Anat.Eniwickl-Gesch.137:270-284.1972

203.- PILGRIM.C.: Function of lysosomes in neurosecretory cells. En:Aspects of neuroendocrinology. (ed.Bargmann y Scharrer). Springer Verlag. Berlín. 1970

204.- POLINGER.I.S.: Properties of embryonic chick heart cells in vivo and in vitro. Anat.Rec.166:363(abst).1970

205.- PORTER.K.R. y PALADE.G.E.: Studies on the endoplasmatic reticulum.III.Its form and distribution in striated muscle. J.Biophys.Biochem.Cytol. 3:269-300. 1957

206.- PRICE.H.M.: Ultrastructure of the skeletal muscle fibre. Cap. 3 en: Disorders of voluntary muscle. (ed.Walton.) .J.& A. Churchill Ltd. 1969

- 207.- PRICE.H.M.,GORDON G.B., PEARSON.C.M.,MUNSAT.T.L. y BLUMBERG.J.M.: New evidence for excessive accumulation of Z-band material in nemalyne myopathy. Proc.Nat.Acad. Sci. U.S. 54:1398. 1965
- 208.- PRICE.H.M., HOWES.E.L. y BLUMBERG.J.M.: Ultrastructural alteration in skeletal muscle fibers injured by cold. Lab.Invest.13:1264-1279. 1964
- 209.- PRZYBYLSKI.R.J.: Ocurrence of centrioles during skeletal and cardiac myogenesis. J.Cell Biol.49:214-221. 1971
- 210.- PRZYBYLSKI.R.J. y BLUMBERG.J.M.: Ultrastructural aspects of myogenesis in the chick. Lab.Invest. 15:836-863. 1966
- 211.- PURDY.J.E.: Synthetic strands of cardiac muscle: Formation and ultrastructure. J.Cell Biol. 55:563-578. 1972
- 212.- RASH.J.E.,SHAY.J.W. y BIESELE.J.J.: Ultrastructure of differentiating muscle cells after actin and tropomyosin extractions. J.Cell Biol.35:110 A (abst). 1967
- 213.- RASH.J.E., SHAY.J.W. y BIESELE.J.J.: Urea extractions of Z bands, intercalated disks and desmosomes. J.Ultrast. Res. 24:181-189. 1968
- 214.- RASH.J.E., SHAY.J.W. y BIESELE.J.J.: A third class of

- filaments in early cardiac myogenesis. J.Cell Biol. 43:  
112 A. 1969
- 215.- RASH.J.E., SHAY.J.W. y BIESELE.J.J.: Cilia in cardiac  
differentiation. J.Ultras.Res. 29:470-484. 1969
- 216.- RASH.J.E., SHAY.J.W. y BIESELE.J.J.: Preliminary bio-  
chemical investigations of the intermediate filaments. J.  
Ultras.Res. 33:399-407. 1970
- 217.- RASH.J.E., BIESELE.J.J. y GEY.G.O.: Three classes of  
filaments in cardiac differentiation. J.Ultras.Res. 33:408  
-435. 1970
- 218.- RAWLES.M.E.: The heart-forming areas of the early  
chick blastoderm. Physiol.Zool. 16:22-42. cit. Orts Llorca  
(1970). 1943
- 219.- RENYI.G.S.de, HOGUE.M.J.: Studies on cardiac muscle  
cells from chick embryos grown in tissue culture. Cit.Ro-  
manoff (1960). Anat.Rec. 70:441-450. 1938
- 220.- RIBAS.D. y RIVERA.J.: comunicacion personal. 1973
- 221.- RICE.R.V.: Conformation of individual macromolecu-  
lar particles from myosin solutions. cit. Huxley.H.E(1965)  
Biochim.Biophys.Acta. 52:602. 1961
- 222.- RICHARDSON.K.C., JARETT.L. y FINCKE.E.W.: Embedding

in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain.Technol.* 35:313-323. 1960

223.- ROBERTIS.E.de, IRALDI.P.: Submicroscopic structure and function. Terminology. En: *Electron microscopic anatomy.* (ed.Kurtz). Academic Press. 1964

224.- ROMANOFF.A.L.: The avian embryo: structural and functional development. Cap. 9: The heart. p. 681. The MacMillan Co. New York. 1960

225.- ROWE.R.W.: Ultrastructure of the Z line of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 51:674-685. 1971

226.- RUMERY.R.E. y BLANDAU.R.J.: The cytodifferentiation of myocardial cells from 4-day embryonic chick hearts grown in culture. *Acta Anat.* 58:116-124. 1964

227.- RUMERY.R.E., BLANDAU.R.J. y HAGEY.P.W.: Observations of living myocardial cells from cultured 48-hour chick hearts. *Anat.Rec.* 141:253-261. 1961

228.- RUMERY.R.E., BLANDAU.R.J. y HAGEY.P.W.: Observations on the differentiation of myofibrils in cultured chick heart cells. *Anat.Rec.* 139:338 (abst). 1961

229.- RUMERY.R.E., HAGEY.P.W. y BLANDAU.R.J.: Observations on the appearance and initial contractions of myofibrils

- in living chick heart muscle. Anat.Rec. 136:269(abst).1960
- 230.- RUMERY.R.E. y RIEKE.W.O.: DNA synthesis by cultured myocardial cells. Anat.Rec. 158:501-508. 1967
- 231.- SABIN.F.R.: Studies on the origin of blood-vessels and of red blood-corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. Carneg. Contrib.Embryol. 9:213-264. cit.De Haan (1965). 1920
- 232.- SCHÄFER.D.: Autophagosomen in gezüchteten Hühnerzellen. Z.Zellforsch.Mik.Anat. 133:201-210. 1972
- 233.- SCHIAFFINO.S., HANZLÍKOVÁ.V. y PIEROBON.S.: Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. J.Cell Biol. 47:107-119. 1970
- 234.- SCHJEIDE.O.A. y VELLIS.J.De.: Cell differentiation. Van Nostrand Rein.Co. Holland. 1970
- 235.- SHAFIQ.S.A.: Electron microscopic studies on the indirect flight muscles of "Drosophila melanogaster".II.Differentiation of myofibrils. J.Cell Biol.17:363-374. 1963
- 236.- SHIMADA.Y., FISCHMAN.D.A. y MOSCONA.A.A.: The fine structure of embryonic chick skeletal muscle cells differentiated "in vitro". J.Cell Biol. 35:445-453. 1967
- 237.- SISSMAN.: cit.Orts Llorca (1970). 1966

- 238.- SLAYTER.H.S. y LOWEY.S.: Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy. cit. Lowey (1972). Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 58:1611. 1967
- 239.- SLAYTER.H.S., WARNER.J.R., RICH.A. y HALL.D.E.: The visualization of polyribosomal structure. J.Mol.Biol.7: 652-657. 1963
- 240.- SMITH.D.S.: The organization and function of the sarco<sup>u</sup>oplasmic reticulum and T-system of muscle cells. cit. Pri<sup>u</sup>ce (1969). Prog.Biophys.Mol.Biol. 16:109. 1966
- 241.- SOMMER.J.R. y JOHNSON.E.A.: Cardiac muscle: a comparative ultrastructural study with special reference to frog and chicken hearts. Z.Zellforsch. 98:437-468. 1969
- 242.- SOMOGYI.E., SOTONYI.P. y BUJDOSO.G.Y.: Electron-microscopic histochemical study of myosin ATPase activity. Histochem. 29:172-177. 1972
- 243.- SPIRA.A.W.: Cell junctions and their role in transm<sup>u</sup>ral diffusion in the embryonic chick heart. Z.Zellforsch. 120:463-487. 1971
- 244.- STOCKDALE.F. y HOLTZER.H.: DNA synthesis and myogenesis. Exptl.Cell Res. 24:508-519. 1961
- 245.- STROMER.M.: cit. Fischman (1970). J.Cell Biol



-178. 1969

246.- STROMER.M.H. y HARTSHORNE.D.J.: Removal and reconsti-  
tution of Z-line material in a striated muscle. J.Cell  
Biol. 35:C23-C28. 1967

248.- SOMMER.J.R.: Chicken cardiac muscle: a transitional  
stage between amphibian and mammalian cardiac muscle. J.  
Cell Biol. 39:127 A (abst). 1968

249.- SOMMER.J.R. y JOHNSON.E.A.: Cardiac muscle: a compa-  
rative study of Purkinje fibers and ventricular fibers.  
J.Cell Biol. 36:497-526. 1968

250.- SOMMER.J.R. y STEERE.R.L.: A propos: transverse tubu-  
les in chicken cardiac muscle. Fed.Proc.28:328(abst). 1969

251.- SOSA-LUCERO.J.C., De La IGLESIA.F.A., LUMB.G., BERGER.  
J.M. y BENCOSME.S,A.: Subcellular distribution of catechol-  
amines and Specific granules in rat heart. Lab. Invest.21:  
19-26. 1969

252.- STALEY.N.A. y BENSON.E.S.: The ultrastructure of frog  
ventricular cardiac muscle and its relationship to mecha-  
nisms of excitation-contraction coupling. J.Cell Biol.38:  
99-114. 1968

253.- SZENT-GYÖRGYI.A.: Studies on muscle. cit. Gergely(1969)

Acta Physiol.Scand. 9,Suppl.XXV. 1945

254.- SZENT-GYÖRGYI.A.G.: Meromyosins, the subunits of myo  
sin. cit. Gergely (1969). Arch.Biochem.42:305. 1953

255.- TAYLOR.E.W.: Chemistry of muscle contraction. En:  
Annual Review of Biochemistry 41:577-616. 1972

256.- TRELSTAD.R.L., HAY.E.D. y REVEL.J.P.: Cell contact  
during early morphogenesis in the chick embryo. Develop.  
Biol.16:78. 1967

257.- VAN BREEMEN.V.L.: Myofibril development observed with  
the electron microscope. Anat.Rec. 113:179-195. 1952

258.- VENABLE.J.H. y COGESHALL.R.: A simplified lead citra  
te stain for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 25:  
407-408. 1965

259.- WADDINGTON.C.H. y PERRY.M.M.: Helical arrangement of  
ribosomes in differentiating muscle cells. Exptl.Cell Res.  
30:599-600. 1963

260.- WAINRACH.S. y SOTELLO.J.R.: Electron microscope stu-  
dy of the developing chick embryo heart. Z.Zellforsch.  
55:622-634. 1961

261.- WALCOTT.B. y RIDGWAY.E.B.: cit. Fischman (1970).Amer.

Zool. 7:499. 1967

262.- WANSON.J.C. y DROCHMANS.P.: Role of the sarcoplasmic reticulum in glycogen metabolism. J.Cell Biol. 54:206-224. 1972

263.- WEBER.A.: Current topics of bioenergetics (ed.Sanadi). p. 203. cit. Lowey (1972). Academic Press. 1966

264.- WEED.I.G.: Cytological studies of developing muscle with special reference to myofibrils, mitochondria, Golgi material and nuclei. Z.Zellforsch. 25:516-540. 1936

265.- WEEDS.A.G. y LOWEY.S.: cit. Lowey (1972). J.Mol.Biol. 61:701. 1971

266.- WEINSTEIN.R.B. y HAY.E.D.: Deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in differentiated cardiac muscle cells of chick embryos. J.Cell Biol. 47:310-316. 1970

267.- WEISSENSFELS.N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie des Hühnerherz-myoblasten. OProtoplasma (Wien). 55:99-113. cit. Firket (1966). 1962

268.- WILLMER.E.N.: Cells and tissues in cultures: methods, biology and physiol. Academic Press 1965

269.- WINEGRAD.S.: Autorradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. cit. Forbes y cols. (1972). J.Gen. Physiol. 48:455-479. 1965

- 270.- WINEGRAD.S.: Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus. cit.Gergely (1969). J.Gen.Physiol. 51:65. 1968
- 271.- YAFFE.D.: Cellular aspects of muscle differentiation in vitro. Cap.2 en: Current topics in developmental Biology. (ed. Moscona y Monroy). 4:37-77. 1969
- 272.- YAFFE.D. y FUCHS.S.: Autoradiographic study of the incorporation of uridine- $H^3$  during myogenesis in tissue culture. Develop.Biol. 15:33-50. 1967
- 273.- YAMAMOTO.T. y TONOMURA.Y.; Reaction mechanism of the  $Ca^{++}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. cit.Gergely (1969). J.Biochem.(Tokyo). 62: 558. 1967

(043) 73  
BOM

