

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - BOTUCATU**

**Estudo comparativo da morfologia ventricular  
em Otophysi: uma abordagem evolutiva**

**Mario Vitor Buzete Gardinal**

**Biólogo**

Botucatu, São Paulo

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - BOTUCATU**

**Estudo comparativo da morfologia ventricular  
em Otophysi: uma abordagem evolutiva**

**Doutorando: Mario Vitor Buzete Gardinal**

**Orientador: Dr. Ricardo C. Benine**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Instituto de Biociências da UNESP- Botucatu como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Zoologia.

Botucatu, São Paulo

2022

G219e

Gardinal, Mario Vitor Buzete

Estudo comparativo da morfologia ventricular em  
Otophysi: uma abordagem evolutiva / Mario Vitor  
Buzete Gardinal. -- Botucatu, 2023  
89 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Ricardo Cardoso Benine  
Coorientadora: Maeli Dal Pai

1. Peixes Anatomia. 2. Sistema cardiovascular. 3.  
Evolução (Biologia). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto  
de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Mario Luiz Gardinal e Andrea Montanha Buzete Gardinal, minha irmã Aline Buzete Gardinal e demais familiares por toda a confiança e dedicação depositada em mim. Vocês sempre serão pilares fundamentais da minha vida.

A minha esposa Vanessa Garcia Vilas Boas que esteve ao meu lado em todos os momentos bons e ruins durante a minha trajetória acadêmica. Organizar um casamento durante o doutorado não foi tarefa fácil, mas tiramos de letra.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Ricardo C. Benine pela sua dedicação e empenho. Obrigado por acreditar no meu tema de pesquisa, sem seu interesse pelos corações dos peixes, esse trabalho não teria sido possível.

A minha Coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maeli Dal Pai, por todo suporte com os procedimentos histológicos e por me permitir acompanhar aulas de histologia incríveis.

Ao Prof. Dr. Fábio Roxo (Fio) pela sua paciência e dedicação em me ajudar com toda a parte de Filogenômica que deixou este trabalho muito mais encorpado.

Aos meus amigos de laboratório: Laís, Gabriel (Pink) e Natália pela parceria nos momentos de trabalho, coleta, café e descontração. Muito obrigado pela parceria e por tornar minha jornada em Botucatu muito mais leve.

Ao Laboratório de Ictiologia do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, pelo suporte e infraestrutura para o processamento anatômico e documentação das amostras.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia Geral do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, Keyla e Ricardo, por toda sua paciência e dedicação em me auxiliar com o processamento das lâminas histológicas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, pelo processamento do material em microscopia eletrônica de varredura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia e à Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Zoologia da Unesp de Botucatu, pelo apoio e infraestrutura.

Aos professores: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini e Profª Drª Irene Bastos Franceschini Vicentini por todos os ensinamentos em Morfologia, Ciência e por serem meus principais pilares acadêmicos.

Aos meus amigos de Bauru: Thalles Fernando Rocha Ruiz, Mateus Rossetto Vidal, Diego Santos e Maira Ferrari por todo o aprendizado e parceria desenvolvidos durante nossa trajetória acadêmica.

A todos os meus amigos de Lins, vocês são os melhores amigos que alguém poderia ter.

*A todos vocês, meu eterno respeito e admiração.*

# DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha esposa, meus pais, todos os meus familiares, meus amigos e a todos os professores que passaram pela minha jornada acadêmica e tiveram papel fundamental em meu aprendizado.*

*Obrigado por tudo.*

## **APOIO FINANCEIRO**

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão de Bolsa de Doutorado (Processo nº 2019/00450-2).

# SUMÁRIO

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Lista de figuras e tabelas .....                                                                      | 9         |
| Resumo.....                                                                                           | 12        |
| Abstract.....                                                                                         | 13        |
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                             | <b>14</b> |
| 1.1. Morfologia do Coração de Teleósteos .....                                                        | 15        |
| 1.2. Os diferentes tipos de ventrículo nas linhagens de peixes e principais hipóteses evolutivas..... | 25        |
| 1.3. A diversidade de espécies do grupo Otophysi .....                                                | 28        |
| <b>2. Objetivos.....</b>                                                                              | <b>28</b> |
| 2.1. Objetivo Geral .....                                                                             | 29        |
| 2.2. Objetivos Específicos.....                                                                       | 29        |
| <b>3. Material e Métodos.....</b>                                                                     | <b>30</b> |
| 3.1. Animais .....                                                                                    | 31        |
| 3.2. Preparação Anatômica.....                                                                        | 32        |
| 3.3. Histologia .....                                                                                 | 33        |
| 3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                                  | 34        |
| 3.5. Imuno-histoquímica.....                                                                          | 36        |
| 3.6. Táxons utilizados e inferências filogenéticas .....                                              | 36        |
| 3.7. Bioinformática .....                                                                             | 37        |
| 3.8. Análise filogenética da matriz concatenada .....                                                 | 37        |
| 3.9. Estimando a morfologia ventricular .....                                                         | 38        |
| <b>4. Resultados e Discussão.....</b>                                                                 | <b>40</b> |
| 4.1. Morfologia do Ventrículo .....                                                                   | 41        |
| 4.2. Inferências funcionais.....                                                                      | 73        |
| 4.3 Evolução dos caracteres morfológicos do ventrículo .....                                          | 76        |
| 4.4. Novas perspectivas e considerações finais.....                                                   | 81        |
| <b>6. Referências.....</b>                                                                            | <b>84</b> |

## Lista de figuras e tabelas

**Fig. 1:** Esquema do coração em teleósteos (KARDONG, 2009).

----- 15

**Fig. 2:** Anatomia ventricular no coração de teleósteos segundo Santer et al. (1983), destacando as anatomias tubular, sacular e piramidal.

----- 18

**Fig. 3:** Microscopia eletrônica de varredura do ventrículo de *Brycon amazonicus* (observações não publicadas).

----- 19

**Fig. 4:** Corte histológico sagital do coração de *Brycon amazonicus* (observações não publicadas).

----- 20

**Fig.5:** Classificação do ventrículo de peixes baseado em Tota et al. (1983).

----- 21

**Fig. 6:** As duas vias de oxigenação presente no coração de peixes.

----- 22

**Fig. 7:** Distribuição das artérias coronárias no ventrículo de *Megaleporinus obtusidens*.

----- 23

**Fig. 8:** Resumo da presença e ausência de cone, bulbo e circulação coronária, assim como os tipos ventriculares na filogenia de peixes.

----- 27

**Fig. 9:** Coleta de exemplares na natureza.

----- 32

**Fig. 10:** Locais e equipamentos utilizados para os processamentos anatômicos e histológicos.

----- 34

**Fig. 11:** Preparo de amostra para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

----- 35

**Fig.12:** Fluxograma exemplificando a metodologia apresentada.

----- 39

**Fig. 13:** Anatomia e histologia do ventrículo de *Astyanax lacustris*.

----- 44

**Fig. 14:** Anatomia e histologia do ventrículo de *Roeboides descalvadensis*.

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| -----                                                                                                                                     | 45 |
| <b>Fig. 15:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Characidium gomesi</i> .                                                        |    |
| -----                                                                                                                                     | 46 |
| <b>Fig. 16:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Cyphocharax modestus</i> .                                                      |    |
| -----                                                                                                                                     | 47 |
| <b>Fig. 17:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Piabina argentea</i> .                                                          |    |
| -----                                                                                                                                     | 48 |
| <b>Fig. 18:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Apareiodon affinis</i> .                                                        |    |
| -----                                                                                                                                     | 49 |
| <b>Fig. 19:</b> Histologia dos ventrículos de <i>Megaleporinus obtusidens</i> , <i>Prochilodus lineatus</i> e <i>Brycon orbignyanus</i> . |    |
| -----                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Fig. 20:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Hemiodus gracilis</i> .                                                         |    |
| -----                                                                                                                                     | 51 |
| <b>Fig. 21:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Phenacogrammus interruptus</i> .                                                |    |
| -----                                                                                                                                     | 52 |
| <b>Fig. 22:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Hypostomus ancistroides</i> .                                                   |    |
| -----                                                                                                                                     | 55 |
| <b>Fig. 23:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Cetopsorhamdia iheringi</i> .                                                   |    |
| -----                                                                                                                                     | 56 |
| <b>Fig. 24:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Imparfinis mirini</i> .                                                         |    |
| -----                                                                                                                                     | 57 |
| <b>Fig. 25:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Corydoras aeneus</i> .                                                          |    |
| -----                                                                                                                                     | 58 |
| <b>Fig. 26:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Cambeva diabola</i> .                                                           |    |
| -----                                                                                                                                     | 59 |
| <b>Fig. 27:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Pimelodella avanhandavae</i> .                                                  |    |
| -----                                                                                                                                     | 60 |
| <b>Fig. 28:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Rhamdia quelen</i> .                                                            |    |
| -----                                                                                                                                     | 61 |
| <b>Fig. 29:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> .                                               |    |
| -----                                                                                                                                     | 62 |
| <b>Fig. 30:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> .                                                |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 63 |
| <b>Fig. 31:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Hoplosternum littorale</i> .                                                                                                                                                               |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 64 |
| <b>Fig. 32:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Eigenmannia virescens</i> .                                                                                                                                                                |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 67 |
| <b>Fig 33:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Gymnotus cuia</i> .                                                                                                                                                                         |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 68 |
| <b>Fig. 34:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Cyprinus carpio</i> .                                                                                                                                                                      |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 69 |
| <b>Fig. 35:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Carassius auratus</i> .                                                                                                                                                                    |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 70 |
| <b>Fig. 36:</b> Anatomia e histologia do ventrículo de <i>Gyrinocheilus aymonieri</i>                                                                                                                                                                |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 71 |
| <b>Fig. 37:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos ventrículos de <i>Hoplias malabaricus</i> , <i>Apareiodon affinis</i> e <i>Gymnotus cuia</i> .                                                                                               |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 72 |
| <b>Fig. 38:</b> Árvore de RAxML a partir de uma matriz com 426.380 caracteres representando 1.469 UCEs, estimada sem partições e com o modelo GTR.                                                                                                   |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 73 |
| <b>Fig. 39:</b> Análise de SIMMAP feita a partir da filogenia proposta com UCEs de 30 espécies pertencentes a subordem Characoidei e ordens Siuriformes e Cypriniformes.                                                                             |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 74 |
| <b>Fig. 40:</b> Técnica de Imuno-histoquímica realizada com anticorpo anti-CD34 (B-6) revelando células endoteliais CD34 positivas em capilares sanguíneos na camada esponjosa do ventrículo de espécies do subclado Otophysi.                       |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 84 |
| <b>Tab. 1:</b> Resumo dos caracteres morfológicos presentes no ventrículo de 28 espécies descritas neste estudo e 9 espécies descritas na literatura pertencentes a subordem: Characoidei e ordens: Siluriformes Gymnotiformes e Cypriniformes ----- |    |
| -----                                                                                                                                                                                                                                                | 73 |

## Resumo

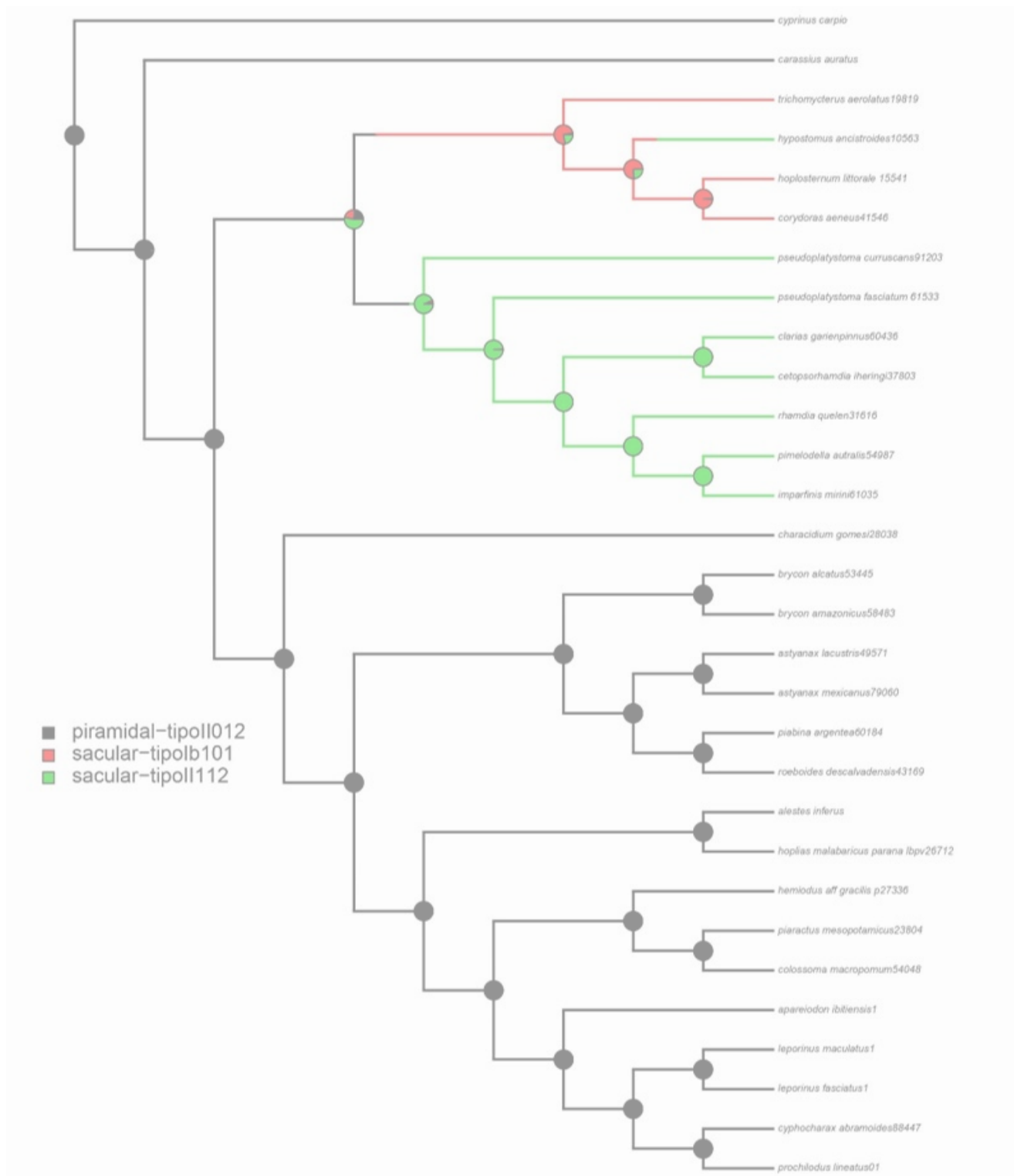
O coração dos peixes é composto por seis componentes anatômicos dispostos em série. Dentre eles, o ventrículo se destaca por apresentar consideráveis variações morfológicas entre as espécies relacionadas à anatomia externa, organização do miocárdio e distribuição dos vasos coronários. Embora a classificação morfológica seja uma ferramenta que, em algum nível, permite inferências sobre a evolução do ventrículo em peixes, até o momento nenhuma análise utilizando métodos filogenéticos comparativos foi realizada. Além disso, ainda se sabe pouco sobre a morfologia cardíaca e sua evolução em teleósteos Neotropicais de água doce. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avançar no entendimento da evolução da morfologia ventricular em teleósteos de água doce da linhagem Otophysi. Para isso, foram estudados os ventrículos de 28 espécies pertencentes aos grupos Characoidei, Siluriformes e Gymnotiformes, sendo que espécies da ordem Cypriniformes foram utilizadas como grupo externo. Os ventrículos foram submetidos a estudos anatômicos, histológicos e ultraestruturais. Em seguida, uma filogenia foi proposta com base em caracteres moleculares previamente sequenciados, com ênfase em elementos de DNA ultraconservados. Posteriormente, os caracteres morfológicos foram incorporados à filogenia proposta e analisados por meio de métodos filogenéticos comparativos. A morfologia piramidal do tipo II esteve presente nos ventrículos de todos os exemplares de Characoidei, Gymnotiformes e Cypriniformes estudados. Já os Siluriformes apresentaram uma maior variabilidade, demonstrando ventrículos saculares dos tipos Ib e II. As análises SIMMAP aplicadas à filogenia permitiram inferir que o ventrículo piramidal do tipo II seria a condição ancestral em Otophysi. Esse tipo de ventrículo teria sido preservado em Characoidei, Gymnotiformes e Cypriniformes, o que indica a evolução desses grupos em ambientes lóticos e com possíveis migrações reprodutivas. Por outro lado, o cenário evolutivo para as espécies da ordem Siluriformes aponta para uma maior diversificação nos hábitos de vida e ocupação de locais com diferentes condições ambientais, o que permite uma maior variação morfológica do ventrículo em função das diferentes necessidades metabólicas das espécies.

**Palavras-chave:** coração, filogenia, peixes, vascularização, ventrículo

## Abstract

The fish heart is composed of six anatomical components arranged in series. Among them, the ventricle stands out for presenting considerable morphological variations among species related to external anatomy, organization of the myocardium, and distribution of coronary vessels. Although morphological classification is a tool that, to some extent, allows inferences about the evolution of the fish ventricle, no analysis using comparative phylogenetic methods has been performed thus far. In addition, little is known about cardiac morphology and its evolution in Neotropical freshwater teleosts. Thus, the objective of this study was to contribute to the understanding of the evolution of ventricular morphology in freshwater teleosts of the Otophysi lineage. For the description and survey of morphological characters, ventricles of 28 species belonging to three main groups, Characoidei, Siluriformes, and Gymnotiformes, were studied, with species of the order Cypriniformes used as an outgroup. The ventricles underwent anatomical, histological, and ultrastructural studies. Subsequently, a phylogeny was proposed based on previously sequenced molecular characters, specifically ultraconserved DNA elements (UCEs). Finally, the morphological characters were incorporated into the proposed phylogeny and analyzed using comparative phylogenetic methods. The type II pyramidal morphology was present in the ventricle of all specimens of Characoidei, Gymnotiformes, and Cypriniformes studied. Siluriformes showed greater variability, demonstrating saccular ventricles of types Ib and II. SIMMAP analyses applied to the phylogeny allowed us to infer that the type II pyramidal ventricle would be the ancestral condition in Otophysi. This type of ventricle would have been preserved in Characoidei, Gymnotiformes, and Cypriniformes, indicating the evolution of these groups in lotic environments and possible reproductive migrations. On the other hand, the evolutionary scenario for species of the order Siluriformes points to greater diversification in life habits and occupation of habitats with different environmental conditions, allowing for greater morphological variation in the ventricle as a result of different metabolic needs of the species.

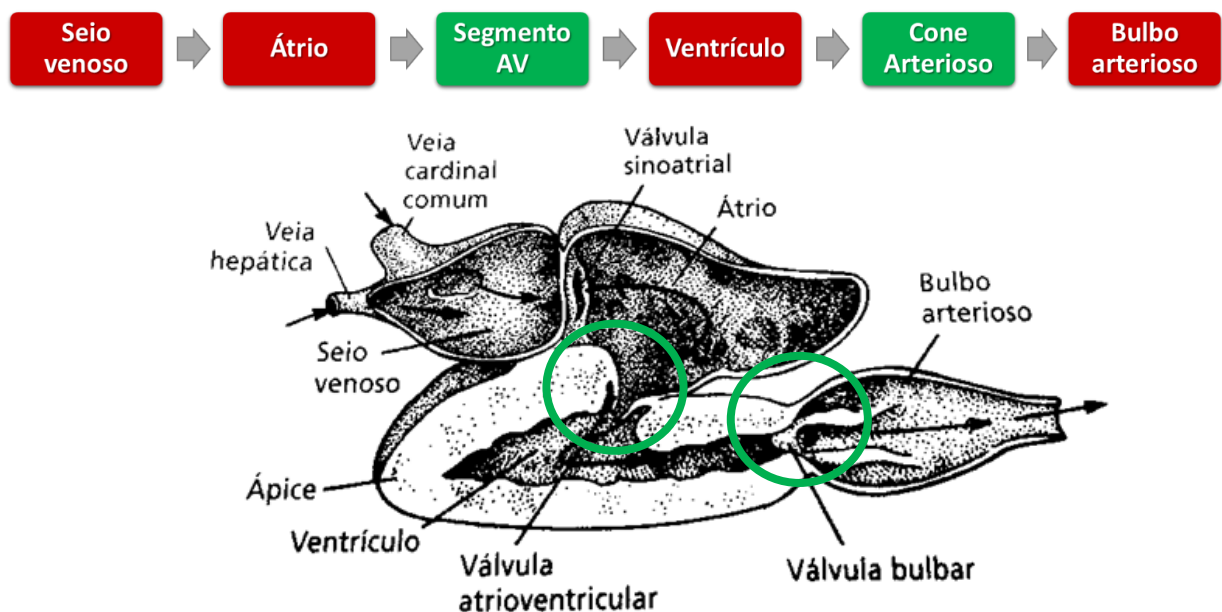
**Keywords:** heart, phylogeny, fish, vascularization, ventricle.



# 1. Introdução

## 1.1. Morfologia do Coração de Teleósteos

O coração dos teleósteos é tradicionalmente descrito como tendo quatro segmentos anatômicos: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (GREER WALKER; SANTER, 1985; FARRELL; JONES, 1992; BURGEE; FARRELL; LILLYWHITE, 1997). No entanto, com os avanços nos estudos sobre a morfologia cardíaca dos peixes, foram identificados dois segmentos adicionais: o segmento atrioventricular (ICARDO; COLVEE, 2011) e o cone arterioso (ICARDO, 2006). De acordo com a revisão de Icardo (2017), ambos os segmentos devem ser considerados para uma definição adequada da morfologia cardíaca em peixes, o que leva a uma descrição do coração com seis componentes dispostos em série, envolvidos por um saco pericárdico: seio venoso, átrio, segmento atrioventricular (segmento AV), ventrículo, cone arterioso e bulbo arterioso (Fig. 1).



**Fig. 1: Esquema do coração em teleósteos (KARDONG, 2009), evidenciando todos os segmentos cardíacos e o sentido do fluxo sanguíneo. Os círculos verdes marcam a região do segmento AV e do cone arterioso.**

O fluxo sanguíneo no coração tem início no seio venoso que funciona como um reservatório elástico de paredes finas constituído principalmente por tecido conjuntivo. Entretanto, também pode apresentar musculatura cardíaca e/ou musculatura lisa em quantidade variável entre as espécies (FARRELL; JONES, 1992; OLSON, 2000). Seu volume é altamente variável, podendo ser igual ou inferior ao volume atrial. Do ponto de vista funcional, este segmento recebe o

sangue rico em CO<sub>2</sub> por meio do ducto de Cuvier e das veias hepáticas e o transmite para o átrio (YAMAUCHI, 1980). Porém, sua contribuição nesta tarefa não é bem definida, uma vez que a musculatura cardíaca é esparsa em muitas espécies e também devido à ausência de válvulas do seio para prevenir o refluxo (SANTER, 1985; FARRELL; JONES, 1992, ICARDO, 2017, FARRELL; SMITH, 2017).

Outra função importante associada ao seio venoso é o controle dos batimentos do coração, uma vez que nele localiza-se o tecido do marca-passo cardíaco (OLSON, 2000). Os feixes de nervos e corpos neuronais estão presentes na parede do seio e formam uma estrutura semelhante a um plexo, que diferem dos gânglios observados em aves e mamíferos por não estarem envolvidos por tecido conjuntivo e apresentarem pouca organização (ICARDO, 2017). Em relação ao suprimento de oxigênio, segundo Farrell et al. (2012), esta câmara não apresenta vasos coronários, sendo inteiramente suprido pelo sangue presente no lúmen.

Em continuidade com o seio venoso, o átrio é localizado em posição dorsal em relação ao ventrículo, sendo caracterizado como uma câmara única e irregular de volume igual ou inferior ao volume ventricular. Sua forma variável é derivada da distância entre o óstio atrioventricular, bulboventricular e da curvatura em S, presente na anatomia cardíaca dos peixes (SANTER, 1985). Esta câmara apresenta maior quantidade de musculatura cardíaca em relação ao seio venoso, mas devido à baixa pressão sanguínea que é capaz de gerar, exige uma demanda de oxigênio relativamente baixa (FARRELL et al., 2012).

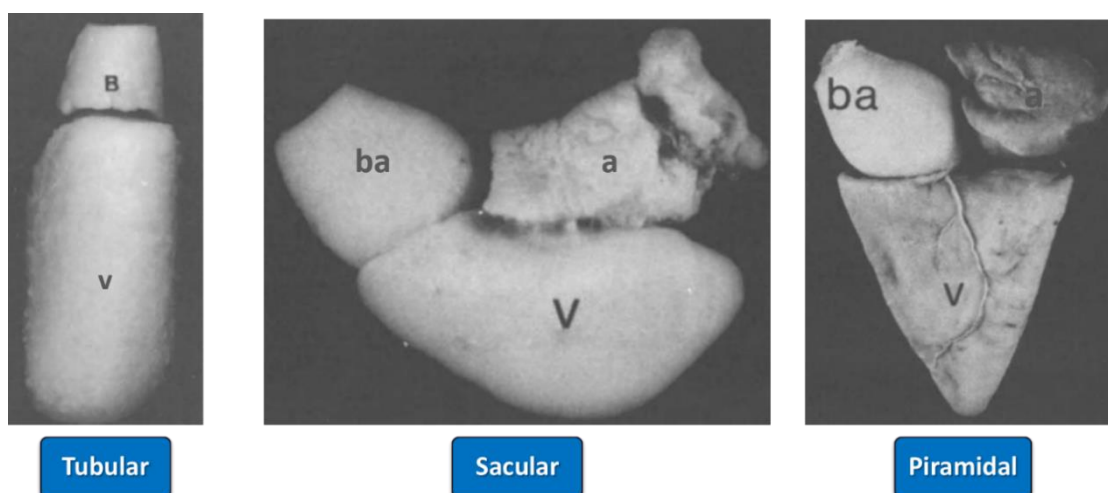
A parede atrial é constituída por trabéculas musculares denominadas de músculos pectíneos, que aparentam irradiar-se ou convergir no orifício atrioventricular. Estas trabéculas são compostas por músculo cardíaco envolto por endocárdio, com colágeno evidente na região subendocárdica e pouco colágeno entre as fibras musculares (ICARDO, 2017). Funcionalmente, o átrio é responsável por enviar o sangue para o ventrículo. Quando ocorre a contração da musculatura, as válvulas sinoatriais previnem o refluxo sanguíneo, aumentando a pressão no sangue e auxiliando sua passagem (OLSON, 2000; FARRELL; SMITH, 2017).

Entre o átrio e o ventrículo, o segmento atrioventricular é descrito como uma estrutura em formato de anel constituído por musculatura cardíaca suprida por

vasos sanguíneos, envolvida por tecido conjuntivo rico em colágeno (ICARDO; COLVEE, 2011). Ainda, o tecido conjuntivo é responsável por isolar parcialmente a musculatura do segmento atrioventricular em relação à presente no átrio e no ventrículo. Este segmento apresenta miocárdio compacto, quase sempre vascularizado, independente da morfologia do miocárdio ventricular. Sua função é desempenhar conexões funcionais e estruturais entre ambas as câmaras (ICARDO; COLVEE, 2011; ICARDO, 2017). O segmento AV também é responsável por ancorar um par de válvulas atrioventriculares compostas principalmente por tecido conjuntivo rico em colágeno. A principal função das válvulas é impedir o refluxo sanguíneo para dentro do átrio durante a sístole ventricular (GARDINAL et al., 2019).

Segundo Rantin e Kalinin (2014), o ventrículo de teleósteos é a principal câmara geradora de pressão no coração e compreende entre 58% a 85% de seu peso. Esta câmara apresenta consideráveis variações morfológicas, e devido a esta característica, torna-se difícil agrupá-lo em categorias (TOTA et al., 1983; TOTA, 1989; SANTER, 1985; FARRELL; JONES, 1992; ICARDO et al., 2005; ICARDO, 2012; ICARDO, 2017). Entretanto, segundo Icardo (2012), a classificação pode ser estabelecida de acordo com a anatomia externa (SANTER et al., 1983; SANTER, 1985) e análise de organização do miocárdio ventricular, associada a presença ou ausência de vascularização coronária (TOTA et al., 1993; TOTA, 1989).

Em relação a classificação anatômica, o ventrículo pode apresentar três tipos: sacular, tubular e piramidal (Fig. 2). Essa classificação possui diversas implicações funcionais. Segundo Santer et al. (1983), ventrículos piramidais são associados a uma parede muscular espessa e vascularizada, sendo comumente observados em espécies com estilo de vida ativo; ventrículos com formato sacular são frequentes em muitos teleósteos marinhos e são associados a espécies com baixa atividade de locomoção, enquanto os tubulares são observados em peixes que apresentam um formato de corpo alongado (SÁNCHEZ-QUINTANA et al., 1996). Entretanto, o significado funcional destas formas anatômicas ainda não é bem estabelecido.

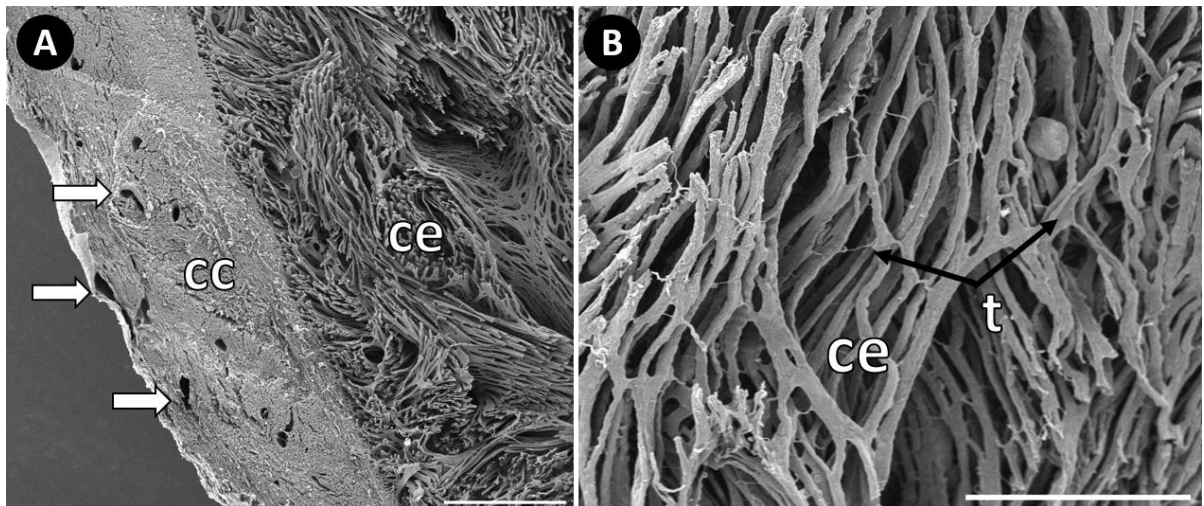


**Fig. 2: Anatomia ventricular no coração de teleósteos segundo Santer et al. (1983), destacando as anatomias tubular, sacular e piramidal. Imagens usadas a partir de Santer et al. (1983).**

Além das características externas, o miocárdio ventricular pode ser classificado em dois tipos: inteiramente trabeculado (camada esponjosa) ou miocárdio misto, constituído por uma camada compacta externa que envolve uma camada esponjosa interna (SATCHELL, 1970) (Fig. 3). Segundo Sánchez-Quintana et al. (1996), ventrículos tubulares ou saculares estariam associados a um miocárdio inteiramente trabeculado, enquanto ventrículos piramidais estariam relacionados a um miocárdio misto. Entretanto, conforme demonstrado por Simões et al. (2002), Icardo et al. (2005) e Gardinal et al. (2018), a relação entre o formato ventricular externo e a arquitetura interna do miocárdio nem sempre é constante, assim como a relação entre o formato externo e o hábito natatório das espécies.

O miocárdio trabeculado (camada esponjosa) é constituído por cardiomiócitos organizados em lâminas trabeculares, enquanto que o miocárdio misto possui uma camada compacta externa formada por um denso agrupamento de feixes musculares (FARRELL; PIERPERHOFF, 2011). De acordo com Farrell e Jones (1992), a espessura relativa e a arquitetura da camada compacta variam entre as espécies. O desenvolvimento da camada compacta é caracterizado pela organização progressiva das fibras cardíacas em camadas de feixes musculares e pode apresentar até três arranjos diferentes, dependendo de sua espessura (ICARDO, 2017). Essa organização torna-se mais evidente em espécies ativas, como peixes-espadas e atuns.

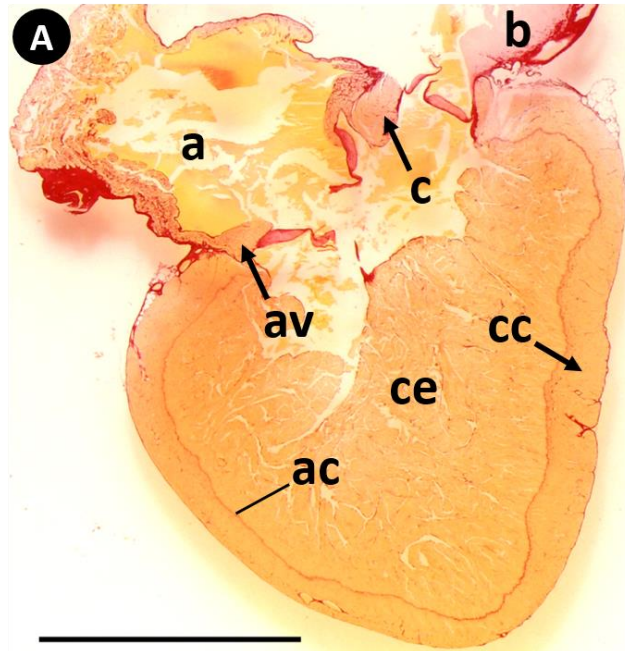
Em relação à camada esponjosa, as trabéculas musculares em formato de lâminas delimitam pequenos espaços intertrabeculares que irradiam a partir do lúmen central (ICARDO et al., 2005; MUNSHI et al., 2001). O lúmen central do ventrículo seria responsável por suportar a maior parte do estresse sistólico, o qual é progressivamente reduzido em direção à periferia. Essa característica protege o miocárdio e mantém a integridade da parede ventricular (Icardo et al., 2005).



**Fig. 3. Microscopia eletrônica de varredura do ventrículo de *Brycon amazonicus*.** A: mioarquitetura ventricular em preparos transversais mostrando a organização da camada compacta externa do miocárdio e a organização trabecular interna (camada esponjosa). Os vasos coronários são observáveis no subepicárdio ventricular e no miocárdio compacto (setas brancas). B: Camada esponjosa demonstrando o sistema altamente ramificado das trabéculas. Abreviações: cc: camada compacta, ce: camada esponjosa, t: trabéculas. Barras de Escala: A: 1mm; B: 500µm. Observações não publicadas.

Entre a camada compacta e esponjosa, destaca-se a presença de colágeno em quantidades variáveis (Fig. 4). De acordo com Tota (1978), o colágeno funcionaria como uma cola, permitindo que o miocárdio atue como uma unidade funcional. No entanto, ao analisar ventrículos de salmonídeos, Pieperhoff et al. (2009) demonstraram que o colágeno nessa região é descontínuo e pouco evidente. Assim, o autor sugeriu que as fibras musculares da camada esponjosa dobram suas pontas para criar uma superfície de contato paralela com a camada compacta. Essa junção é enriquecida por desmossomos e componentes de fáscia. Segundo Icardo (2012), o colágeno é um componente juncional sempre presente entre as camadas compacta e esponjosa, mas em quantidade variável entre as espécies. Em vez de rejeitar a hipótese descrita por Tota (1978) ou o modelo descrito por Pieperhoff et al. (2009),

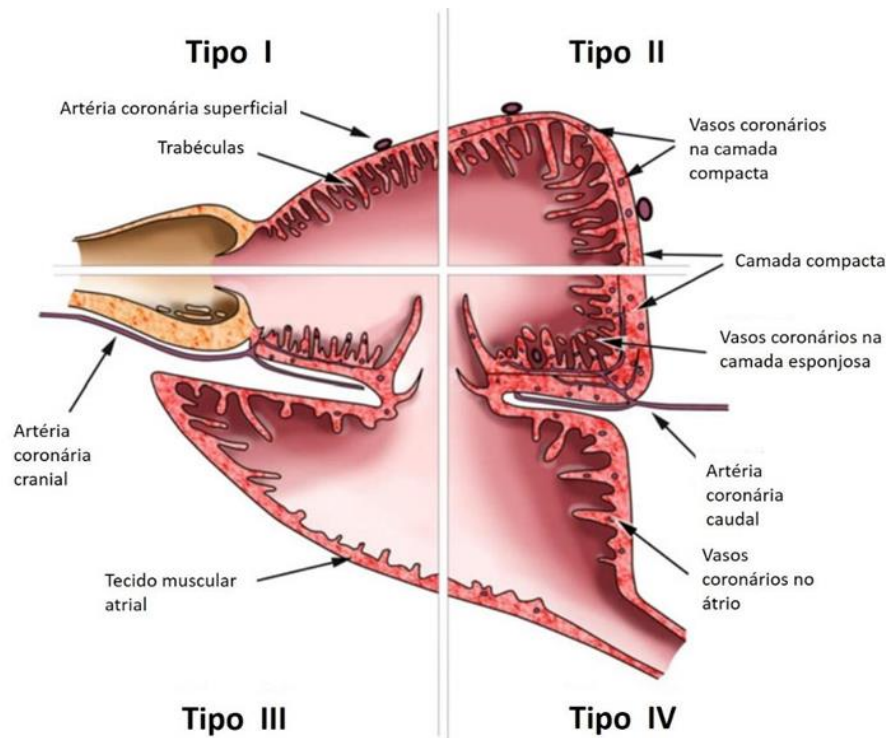
sugere-se que a combinação de ambos estabeleça a sinergia necessária para manter as diferentes organizações musculares unidas, promovendo a contração simultânea necessária para a sístole coordenada do ventrículo.



**Fig. 4: Corte histológico sagital do coração de *Brycon amazonicus* (observações não publicadas).** A: secção sagital do ventrículo evidenciando o miocárdio misto formado por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Observe a borda de colágeno (linha vermelha) presente no limite entre a camada compacta e a camada esponjosa. Abreviações: a: átrio; ac: arco de colágeno; av: segmento atrioventricular; b: bulbo arterioso; c: cone arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa. Coloração: Picrosirius. Barra de escala: 5mm.

Uma das formas mais relevantes de classificação cardíaca em peixes foi proposta por Tota et al. (1983) e revisada por Durán et al. (2015) e Farrell e Smith (2017). Essa classificação agrupa o ventrículo em quatro tipos principais, levando em consideração a presença e a espessura da camada compacta, bem como a extensão da vascularização coronária no miocárdio (Fig. 5). Assim, os ventrículos do tipo I apresentam apenas miocárdio esponjoso, com ausência de camada compacta e vascularização coronária (Ia) ou com vascularização coronária restrita ao espaço subepicárdico (Ib). Já os tipos II, III e IV possuem miocárdio misto, formado por uma camada esponjosa interna e uma camada compacta externa. Os ventrículos do tipo II apresentam vasos coronários na camada compacta, mas esses não alcançam a camada esponjosa, enquanto os ventrículos do tipo III e IV

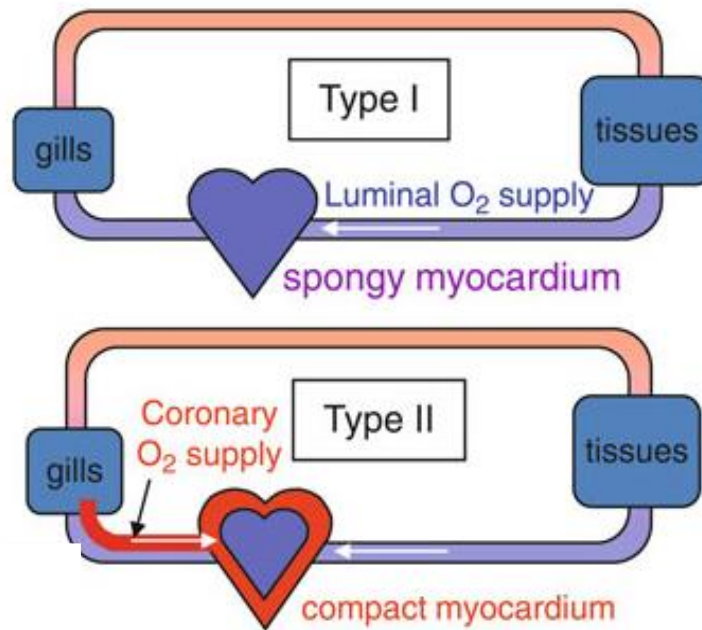
diferem na proporção do miocárdio formado pela camada compacta, mas os vasos coronários penetram tanto na camada compacta quanto nas trabéculas da camada esponjosa. Cabe destacar que a classificação proposta por Tota et al. (1983), evidenciando quatro tipos de ventrículo, tem sido adotada tanto para o coração de Chondrichthyes quanto de Osteichthyes (SANTER, 1985; DAVIE; FARRELL, 1991; FARRELL; JONES, 1992; GRIMES; KIRBY, 2009; ICARDO, 2012; FARRELL et al., 2012; DURÁN et al., 2015; ICARDO, 2017; FARRELL; SMITH, 2017).



**Fig.5: Classificação do ventrículo de peixes baseado em Tota et al. (1983).** Imagem original adaptada por Grimes e Kirby (2009) de Davie e Farrell (1991), utilizada a partir de Farrell et al. (2012).

O suprimento de oxigênio no miocárdio ventricular pode ocorrer por duas vias distintas: luminal e coronária (Fig. 6). Na via luminal, o oxigênio chega ao músculo cardíaco diretamente pelo contato do sangue com as trabéculas musculares no lúmen. Essa forma de suprimento está associada apenas ao miocárdio trabeculado, uma vez que o sangue luminal não percorre a camada compacta nos miocárdios mistos (DAVIE; FARRELL, 1991). Já na via coronária, o sangue rico em O<sub>2</sub> chega ao miocárdio por meio dos vasos coronários, que têm origem a partir das artérias hipobranquiais (FARRELL; JONES, 1992; OLSON, 2000). Essa via está sempre presente na camada compacta e também pode

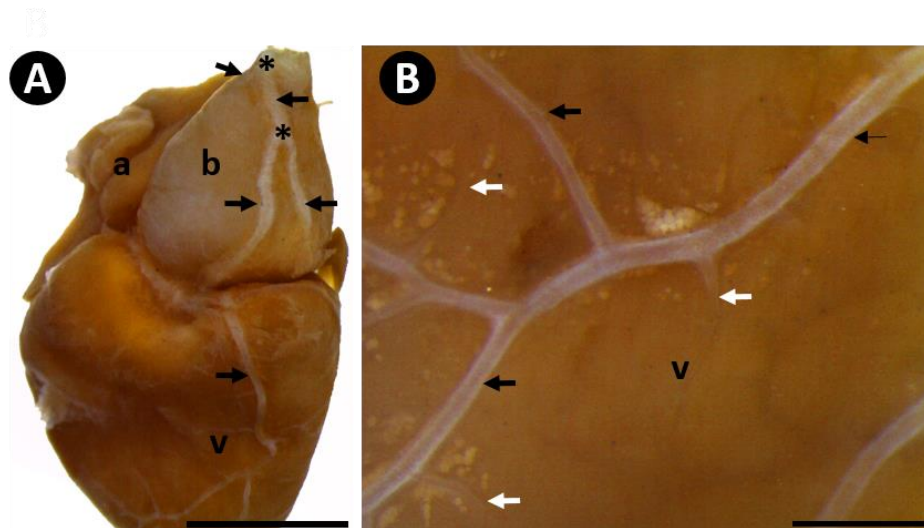
penetrar as trabéculas do miocárdio esponjoso em algumas espécies com ventrículos do tipo III e IV (TOTA et al., 1983; DAVIE; FARRELL, 1991; COX et al., 2016). Em espécies que possuem o miocárdio misto, ambas as formas de suprimento ocorrem.



**Fig. 6: As duas vias de oxigenação presente no coração de peixes, somente luminal, típica de corações tipo I e luminal/coronária, presentes em corações de tipo II. Figura utilizada a partir de Farrell et al. (2012).**

A circulação coronariana em peixes tem origem a partir das artérias hipobranquiais, formadas por junções das artérias branquiais eferentes. A partir dessas artérias, originam-se os ramos coronários direito e esquerdo, que podem se fundir e alcançar o coração pela região cranial. Além dessa via, em algumas espécies, pode ocorrer a presença de artérias coronárias caudais que se originam a partir da artéria coracóide (primeiro ramo da artéria aorta dorsal) e chegam ao coração pela superfície dorsal, por meio de ligamentos pericárdicos (OLSON, 2000). Segundo Tota et al. (1983), as artérias coronárias que chegam ao coração pelo bulbo arterioso (em teleósteos) ou cone arterioso (em elasmobrânquios) podem ramificar-se no ventrículo, formando duas redes distintas: hilar ou extrahilar. A rede hilar é formada quando a artéria coronária percorre a superfície do bulbo e, posteriormente, penetra a parede do ventrículo diretamente na região bulboventricular. Por outro lado, a rede extrahilar é constituída por vasos que

partem das artérias coronárias principais e ramificam-se na superfície ventricular abaixo do epicárdio, formando o sistema extramural (Fig. 7). Em seguida, os vasos coronários do sistema extramural penetram a parede ventricular em diferentes regiões, podendo formar uma rede vascular restrita à região subepicárdica e alcançar somente o nível da camada compacta, ou atingir ambas as camadas compacta e esponjosa.



**Fig. 7: Distribuição das artérias coronárias no ventrículo de *Megaleporinus obtusidens*.** A: artéria coronária principal chega ao coração pela superfície ventral do bulbo arterioso onde se bifurca duas vezes (asteriscos). Os ramos coronários direito e esquerdo assumem trajetória descendente em direção ao ventrículo (setas pretas). B: os ramos coronários direito e esquerdo se ramificam na superfície ventricular e penetram o músculo cardíaco (setas pretas/brancas). Abreviações: a: átrio; b: bulbo arterioso; v: ventrículo. Imagem usada a partir de GARDINAL et al., 2018.

Após a sístole ventricular, o sangue é encaminhado para o trato de saída do coração. Em peixes, o trato de saída é o segmento interposto entre o ventrículo e a artéria aorta ventral. Esse segmento desempenha papéis importantes, como conexões estruturais, prevenção do refluxo sanguíneo e controle da pressão arterial. Essas funções estão relacionadas à composição histológica e histoquímica dos segmentos (LORENZALE et al., 2018; GARDINAL et al., 2019). Em chondrichthyes, estudos anteriores relataram que o trato de saída era composto apenas por um cone arterioso formado por músculo cardíaco com um número variável de válvulas (PARSON, 1930; SATCHELL; JONES, 1967; SANS-COMA et al., 1995). No entanto, estudos conduzidos por Durán et al. (2008) no tubarão-gato do Atlântico (*Galeus atlanticus* Vaillant, 1888) mostraram que o componente distal

do trato de saída era morfologicamente diferente da aorta ventral e do cone, sendo descrito pela primeira vez um bulbo arterioso elástico no trato de saída de chondrichthyes.

A evolução do coração em osteichthyes foi marcada pela progressiva diminuição do cone arterioso e aumento do bulbo arterioso, especialmente em teleósteos. A princípio, o cone arterioso era observado apenas em chondrichthyes, actinopterygii basais e teleósteos basais (elopomorpha), sendo considerado ausente em linhagens de teleósteos mais derivados. A perda do cone pôde ser atribuída a dois fatores: uma invaginação do ventrículo (SMITH, 1918) ou uma consequência direta da evolução cardíaca (SANTER, 1985). No entanto, Icardo (2006) realizou uma pesquisa com 28 espécies de diferentes famílias e ordens e observou que o cone arterioso também estava presente no coração de teleósteos derivados, sendo representado por um segmento anatômico discreto localizado entre o ventrículo e o bulbo arterioso, formado por miocárdio compacto com mais colágeno e elastina em relação ao encontrado na musculatura ventricular (ICARDO, 2006; SCHIB et al., 2002). Assim como o segmento AV, o cone ancora um par de válvulas do cone ricas em colágeno e pode apresentar vasos sanguíneos mesmo quando o miocárdio ventricular não é vascularizado.

Diferentemente do observado em chondrichthyes e actinopterygii basais, em teleósteos, o bulbo é descrito como uma câmara única de parede espessa, localizado entre o ventrículo e a aorta ventral (FARRELL; JONES, 1992). Segundo Icardo (2017), o bulbo é dominante no trato de saída de teleósteos e é constituído principalmente por tecido conjuntivo e musculatura lisa. Essa câmara apresenta capacidade de expansão, funcionando como um reservatório elástico para o sangue durante a sístole ventricular, absorvendo a pressão gerada pelo ventrículo e liberando um fluxo constante de sangue de maneira ativa para as brânquias (função "windkessel") (FARRELL, 1979). Seu formato externo pode variar de piriforme e alongado a espesso e robusto (ICARDO, 2012). A superfície interna é caracterizada pela presença de cristas longitudinais que ocupam toda a sua extensão, podendo ser proeminentes ou discretas, acompanhando o formato do bulbo, dependendo da espécie (FARRELL; JONES, 1992).

Sob uma perspectiva evolutiva, Moriyama et al. (2016) utilizaram manipulação genética em experimentos com embriões de zebrafish e

demonstraram o envolvimento da elastina b na morfogênese do bulbo arterioso. Essa nova forma de elastina teria sido originada após o evento de duplicação do genoma inteiro que ocorreu na raiz da linhagem de teleósteos, cerca de 350 milhões de anos atrás. Funcionalmente, a neofuncionalização da elastina teria levado a um refinamento nas funções exercidas pelo bulbo arterioso, tornando essa câmara fundamental para o sucesso adaptativo dos teleósteos e morfologicamente única em relação ao observado em outros grupos (LORENZALE et al., 2018).

## **1.2. Os diferentes tipos de ventrículo nas linhagens de peixes e principais hipóteses evolutivas.**

A evolução do ventrículo em peixes é um tema que está em constante discussão na literatura. Embora a fossilização cardíaca seja possível (MALDANIS et al., 2016), não existem dados paleontológicos que permitam concluir a respeito do coração basal em gnathostomados. Portanto, a classificação do ventrículo proposta por Tota et al. (1983), com base na organização do miocárdio e na extensão da vascularização coronariana, é um método que permite inferir, até certo ponto, a respeito da evolução do ventrículo em diferentes linhagens de peixes (FARRELL et al., 2012; DURÁN et al., 2015). Para a formulação das principais hipóteses evolutivas, foi necessário o conhecimento da morfologia cardíaca em representantes vivos dos agnatas (ICARDO et al., 2016) e gnathostomatas basais, como os chondrichthyes e actinopterygii basais (DURÁN et al., 2015; LORENZALE et al., 2018).

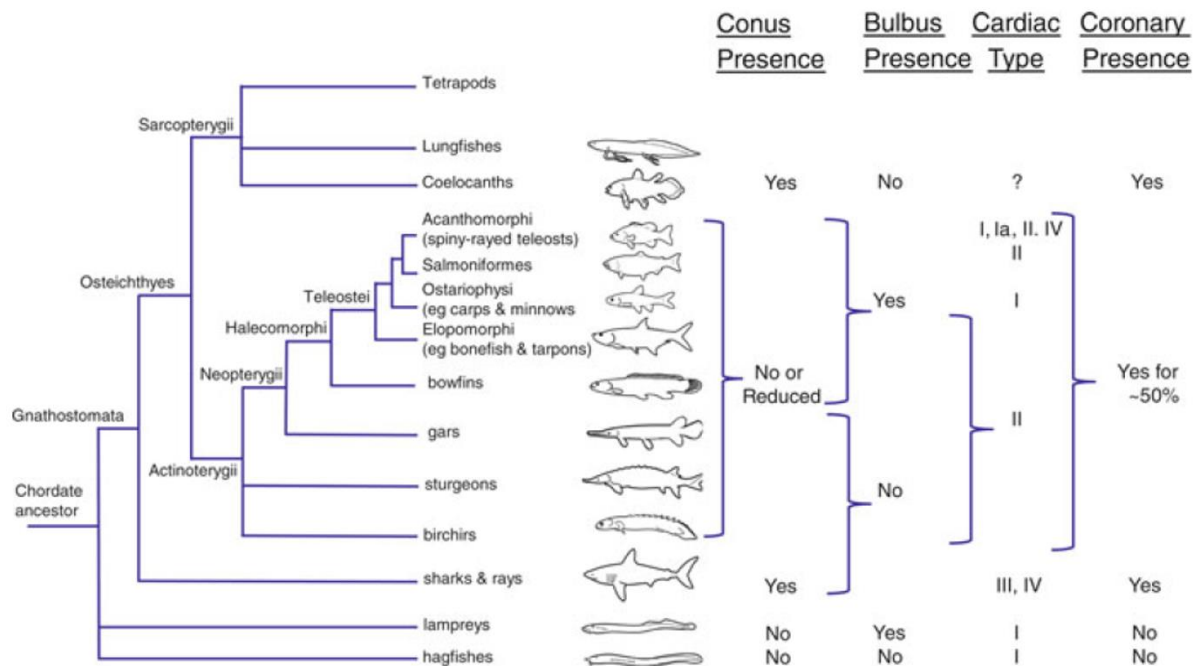
O ventrículo do tipo I está presente nos agnatha vivos, como as feiticeiras e as lampreias (ICARDO et al., 2016). Nesses grupos, o ventrículo é caracterizado pela ausência de vasos coronários e pelo miocárdio inteiramente trabeculado, suprido apenas pelo processo de difusão que ocorre entre o sangue presente no lúmen e as lâminas trabeculares (ICARDO et al., 2016; FARRELL et al., 2012). O processo de compactação ventricular e o desenvolvimento dos vasos coronários teriam ocorrido cedo na linhagem dos vertebrados, juntamente com o desenvolvimento da mandíbula e das vértebras. Com o desenvolvimento dessas estruturas, os peixes teriam sido capazes de adotar um novo hábito de vida predatório, levando a um aumento na demanda de oxigênio no coração. Assim, a

hipóxia localizada no miocárdio poderia ter atuado como uma importante pressão seletiva a favor do desenvolvimento da circulação coronariana, assim como o aumento da demanda metabólica, levando ao processo de compactação do miocárdio e originando o miocárdio misto (FARRELL et al., 2012).

Segundo a hipótese de Farrell et al. (2012), apoiada pelo estudo de Durán et al. (2015), o miocárdio misto é considerado a condição basal da mioarquitetura ventricular em Gnathostomata. Essa condição foi mantida na mioarquitetura ventricular dos Chondrichthyes atuais (LORENZALE et al., 2018), sendo os tipos III e IV presentes em todos os Elasmobranchii estudados até o momento (SANTER; GREER WALKER, 1980; TOTA et al., 1983; TOTA, 1989; SÁNCHEZ-QUINTANA et al., 1996; FARRELL et al., 2012; DURAN et al., 2015; COX et al., 2016). No entanto, ao estudar a mioarquitetura ventricular em Holocephali, grupo irmão dos Elasmobranchii, Durán et al. (2015) observaram ventrículos dos tipos I e III, sugerindo que a redução da camada compacta (tipo III) ou mesmo sua ausência (tipo I) deveriam ser consideradas características derivadas. A perda do miocárdio compacto também teria ocorrido repetidamente em diferentes táxons de Actinopterygii durante a evolução (FARRELL et al., 2012, DURÁN et al., 2015; LORENZALE et al., 2018).

Em táxons basais de Actinopterygii, como os esturjões, o modelo de ventrículo tipo III, semelhante ao observado em muitos elasmobrânquios, foi mantido (FARRELL, 2007). Por outro lado, mais próximo aos teleósteos derivados, como os tarpões e enguias (Elopomorpha), apresentam ventrículo do tipo II, no qual os vasos coronários teriam regredido e se restringido apenas à camada compacta (FARRELL et al., 2012). Quanto aos teleósteos, a maioria das espécies estudadas (50% a 80%) apresenta o ventrículo tipo I inteiramente trabeculado, sendo o ventrículo tipo II o mais frequente em espécies com miocárdio misto (SANTER; GREER WALKER, 1980; SANTER, 1985; FARRELL; JONES, 1992; FARRELL et al., 2012; ICARDO, 2012, 2017). Neste grupo, o ventrículo tipo III ainda não foi observado, e o tipo IV foi encontrado apenas em espécies de hábito natatório intenso e endotermia parcial, como os peixes-espada e os atuns (TOTA et al., 1983). Desta forma, a hipótese estabelecida por Farrell et al. (2012) é que muitas linhagens de teleósteos teriam revertido ao ventrículo ancestral tipo I, tornando-se

menos dependentes da circulação coronariana. Um resumo do cenário evolutivo descrito acima está presente na Fig. 8.



**Fig. 8: Resumo da presença e ausência de cone, bulbo e circulação coronária, assim como os tipos ventriculares na filogenia de peixes.** Imagem original de Farrell et al. (2012).

Em relação ao formato externo e à mioarquitetura do ventrículo, Tang et al. (2018) estudaram o desenvolvimento do coração em duas populações diferentes de *Astyanax mexicanus*, uma população de caverna e uma população de superfície. Ambas as populações apresentaram um ventrículo piramidal associado a um miocárdio misto, independentemente do hábito natatório. No entanto, a população de superfície mais ativa mostrou um ventrículo piramidal mais angular e uma proporção maior da camada compacta em comparação com a população de caverna, que tinha um hábito sedentário. Essas diferenças morfológicas coincidiram com diferenças funcionais, sendo que a população de superfície apresentou uma maior frequência cardíaca em relação à população de caverna. Ao acompanhar o desenvolvimento de ambas as populações em condições de laboratório, os autores perceberam que as diferenças morfológicas apareciam cedo no desenvolvimento e sem a influência de fatores ambientais. Por fim, ao realizar um cruzamento entre as duas populações, observaram na geração F1 que o coração apresentava uma mistura de ambos os fenótipos. Assim, concluíram que

as características morfológicas do ventrículo estavam embutidas no genoma e eram geneticamente reguladas.

Diante do exposto, apesar da classificação morfológica do ventrículo em quatro tipos ser uma ferramenta que, em algum nível, permita inferências sobre sua evolução, nenhuma análise utilizando métodos filogenéticos comparativos para os caracteres do ventrículo foi realizada nas diferentes linhagens de peixes até o momento. Assim, a possibilidade de os caracteres morfológicos do ventrículo estarem fixados no DNA das espécies (TANG et al., 2018) aponta para a necessidade de estudos que abordem esses caracteres sob uma perspectiva filogenética.

### **1.3. A diversidade de espécies do grupo Otophysi**

Apesar de inúmeros estudos descreverem o ventrículo dos peixes, são poucos os trabalhos que abordaram a morfologia cardíaca em espécies neotropicais (HOCHACHKA et al., 1978; CAMILLI et al., 1989; GONÇALVES et al., 1990; SIMÕES et al., 2002; GARDINAL et al., 2018; TANG et al., 2018; GARDINAL et al., 2019).

A região neotropical é conhecida por abrigar uma extraordinária diversidade de peixes de água doce, representando uma porção significativa da diversidade global. Com mais de 6.000 espécies, o número de espécies de peixes neotropicais corresponde a cerca de 20% a 25% de todas as espécies de peixes do mundo (REIS et al., 2016). Essa região é particularmente notável pela sua concentração de espécies em relação aos recursos hídricos disponíveis, uma vez que essa enorme biodiversidade é encontrada em menos de 0,003% das massas de água do planeta. Dentro desse cenário diversificado, os peixes neotropicais estão agrupados principalmente em três grandes linhagens: Siluriformes (bagres), Gymnotiformes (peixes-faca sul-americanos) e Characoidei (tetras, piranhas) (ALBERT; REIS, 2011). Essas linhagens representam a maior parte da diversidade de espécies neotropicais, destacando-se pela sua ampla distribuição e adaptações únicas aos diferentes ambientes aquáticos presentes na região.

A diversidade taxonômica dos peixes neotropicais é acompanhada por uma notável diversidade funcional. Estudos recentes têm demonstrado que a região neotropical apresenta a maior diversidade funcional em comparação com outras regiões biogeográficas (TOUSSAINT et al., 2016). Essa diversidade funcional reflete as diversas estratégias adaptativas desenvolvidas pelos peixes para sobreviver em diferentes habitats, incluindo adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais. A grande variedade de nichos ecológicos disponíveis na região, como rios, lagos, pântanos e ambientes de água doce isolados, proporciona uma ampla gama de desafios e oportunidades para os peixes neotropicais, impulsionando a evolução de características únicas em cada linhagem.

Apesar da importância dos peixes neotropicais para a biodiversidade global e para o entendimento da evolução dos peixes de água doce, a morfologia cardíaca dessas espécies ainda é pouco explorada na literatura científica. A maioria dos estudos sobre o coração de peixes tem se concentrado em outras regiões geográficas, deixando lacunas significativas no conhecimento sobre a morfologia cardíaca dos peixes neotropicais. Portanto, há uma necessidade urgente de investigações abrangentes e detalhadas sobre a morfologia e a função cardíaca dessas espécies, a fim de compreender melhor a sua adaptação aos diferentes ambientes aquáticos e contribuir para a conservação e manejo adequado dessas populações de peixes únicas.

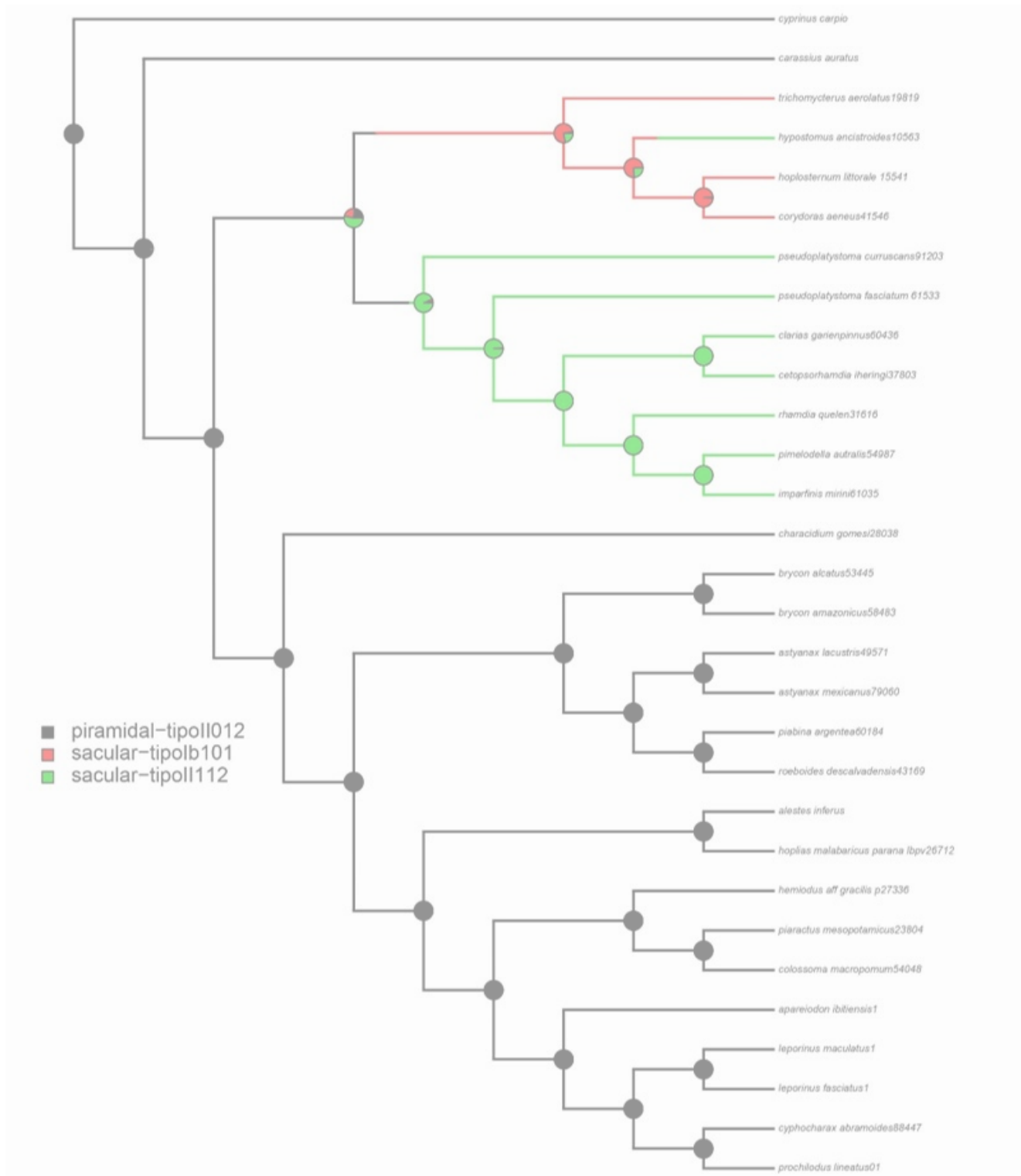
## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Inferir sobre a evolução dos caracteres morfológicos do ventrículo em espécies pertencentes ao subclado Otophysi.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Descrever as características morfológicas do ventrículo e a distribuição de vasos coronários em espécies do subclado Otophysi: Characoidei, Siluriformes, Gymnotiformes e Cypriniformes.
- Propor uma filogenia com espécies do subclado Otophysi utilizando elementos ultra conservados de DNA.
- Mapear os caracteres morfológicos do ventrículo na filogenia proposta utilizando métodos filogenéticos comparativos.



### 3. Material e Métodos

### 3.1. Animais

Os peixes utilizados neste estudo foram coletados em dois rios próximos a região de Botucatu –SP: Ribeirão Capivara (S 22°44' W 48°23') (Fig. 9A) e Hortelã (S 22°55' W 48°30') (Fig. 9B). Para as coletas, foi necessário o auxílio de peneira e rede de arrasto (Figs. 9C, D). Foram coletadas 16 espécies e um total de 3 a 5 exemplares por espécie considerando ambas as localidades. *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837), *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) e *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) foram coletadas no Rio Paraná, região de Castilho/SP com auxílio de vara de pesca e puça. *Phenacogrammus interruptus* (Boulenger, 1899), *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) e *Gyrinocheilus aymonieri* (Tirant, 1883) foram obtidos através e fornecedores locais em lojas de aquarismo. Nos casos de coleta em campo, os peixes foram acomodados em caixa térmica, com capacidade para 18 litros, contendo a mesma água do local de coleta, oxigenada com auxílio de aerador (Figs. 9E, F). Os exemplares foram transportados até o Laboratório de Ictiologia do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia do Instituto de Biociências, Unesp Botucatu, onde foram realizados os procedimentos anatômicos.



**Fig. 9: Coleta de peixes na natureza.** A e B: Coletas realizadas nos rios Capivara (A) e Hortelã (B). C e D: Processo de coleta dos peixes na vegetação marginal com o auxílio de peneira. E e F: Exemplos de *Gymnotus cuia* (E) e *Imparfinis mirini* (F) momentos antes do armazenamento em caixa térmica.

### 3.2. Preparação Anatômica

Todos os exemplares coletados foram mantidos em uma caixa térmica por aproximadamente 3 horas até o momento da coleta dos corações. Os peixes foram eutanasiados individualmente em um aquário contendo uma solução de eugenol previamente diluída em etanol 100% na proporção de 100mg/L. Para o aquário, foram utilizados 3,88 litros de água e 12 ml de solução de eugenol, totalizando 4 litros e mantendo a proporção de 300 ml/L, conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu

(Protocolo N° 1213). Em seguida, foi realizada, para cada exemplar, uma secção longitudinal na linha mediana da região ventral, a fim de expor a cavidade pericárdica. Após a remoção dos músculos hipobranquiais, o pericárdio foi seccionado para expor o coração. O coração foi removido e imediatamente posicionado em uma placa de Petri contendo solução fisiológica e encaminhado para fotodocumentação com o auxílio do estereomicroscópio Zeiss (modelo Discovery V20). Após documentação, os corações foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por no máximo 48 horas e encaminhados para rotina de histologia. Em corações de espécies obtidas no rio Paraná, os corações foram removidos no local e imediatamente fixados. A fixação e fotodocumentação ocorreram como descrito acima. As imagens das espécies foram obtidas a partir do site *fishbase.se*, e nos trabalhos de Santos et al. (2017) e Hoffmann et al. (2015).

### 3.3. Histologia

Após a fixação, os corações foram submetidos à rotina de inclusão em historresina (Historesin Embedding Kit, Leica) e em Paraplast (Plus, McCormick Scientific). No caso da inclusão em historresina, o material foi seccionado com uma espessura variando entre 1-3  $\mu\text{m}$ , utilizando um micrótomo Leica (modelo RM 2165) equipado com navalha de vidro. As seções foram coradas com azul de Toluidina, adicionando-se tetraborato de sódio para uma descrição geral da mioarquitetura e da distribuição dos vasos coronários, conforme descrito por Gardinal et al. 2018. Para a inclusão em Paraplast, as seções foram cortadas em espessuras variando entre 5-10  $\mu\text{m}$ , utilizando um micrótomo Leica (modelo RM 2165) equipado com navalha de aço. Essas seções foram coradas com tricrômico de Masson e Picrosirius (JUNQUEIRA, 1979) para identificação geral do tecido conjuntivo e para a identificação de colágeno em diferentes regiões do ventrículo. Todas as seções foram documentadas utilizando uma câmera Leica (modelo DFC 300FX) acoplada a um microscópio Leica (modelo DMLB) (Fig. 10C, D).

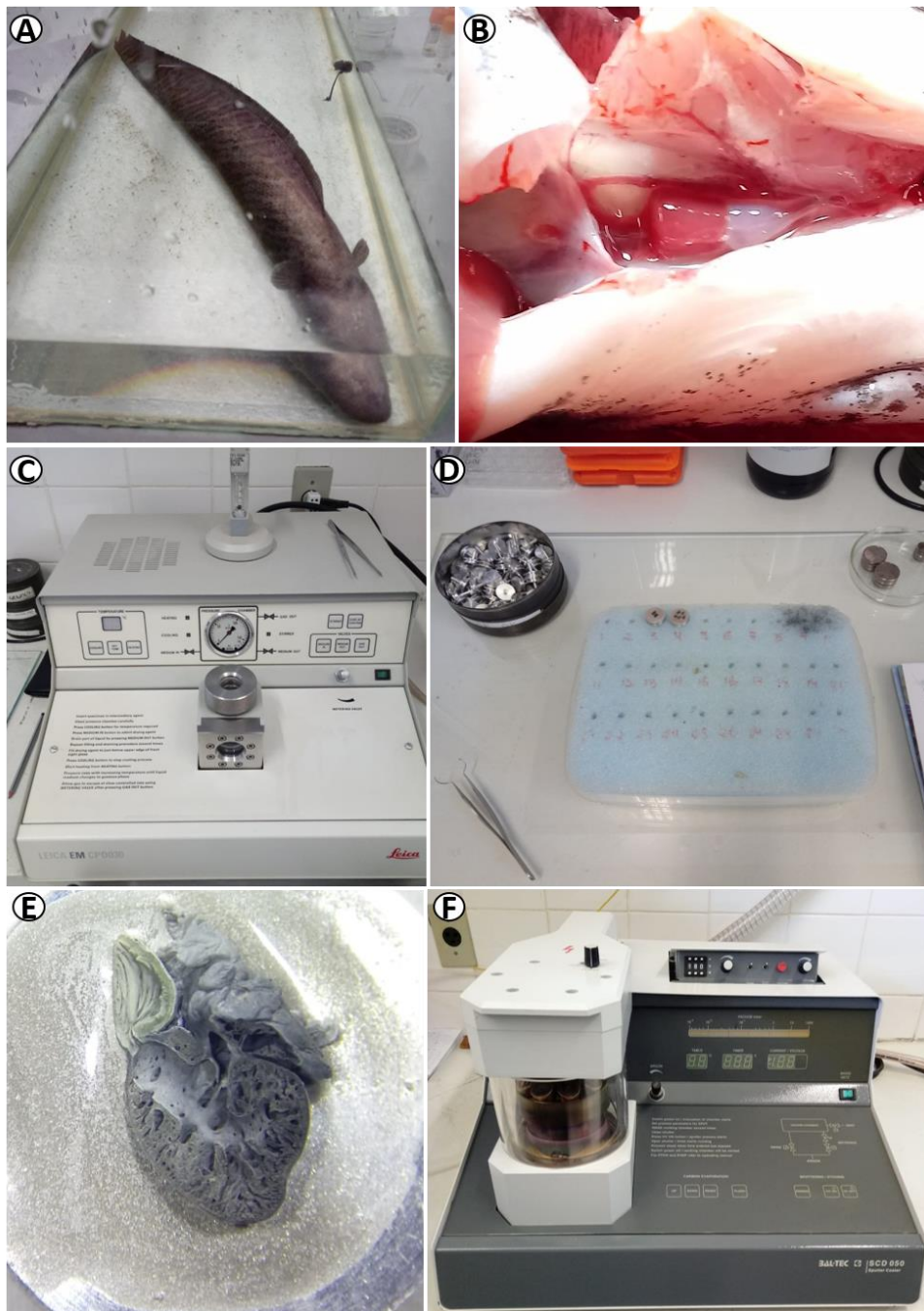


**Fig. 10: Locais e equipamentos utilizados para os processamentos anatômicos e histológicos.** A: Laboratório de Sistemática e Evolução de peixes do Departamento de Biodiversidade e Estatística evidenciando os equipamentos necessários para a coleta dos corações. B: Estereomicroscópio Zeiss (modelo Discovery. V20) com câmera embutida, utilizado para fotodocumentação anatômica. C: Laboratório Multiusuário de Histologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, evidenciando equipamentos necessários para o processamento histológico. D: Microscópio Leica (modelo DMLB) utilizado para fotodocumentação histológica.

### 3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a preparação dos tecidos, foram utilizados ventrículos previamente fixados em solução de Glutaraldeído. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em solução tamponada de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Após a desidratação em séries graduadas de acetona, as amostras foram submetidas ao secador de ponto crítico - EMS 850 (Emitech, EUA) (Fig. 11C), montadas em bases metálicas (Fig. 11D, E) e metalizadas com uma mistura coloidal de ouro-paládio usando o aparelho Balzers® MED-010 (Fig. 11F). As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss EVO MA10 no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal, e também com o microscópio modelo

FEI Quanta 200 no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Botucatu.



**Fig. 11: Preparo de amostra para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).** A: Eutanásia de um exemplar de *Gymnotus cuia* por imersão em solução de eugenol. B: Exposição do coração de *Pseudoplatystoma corruscans* após remoção dos músculos hipobranquiais e abertura do pericárdio. C: Após desidratação do ventrículo em acetona e pós fixação com tetróxido de ósmio, as amostras passaram por secador de ponto crítico EMS 850 (Emitech®, EUA). D: montagem das amostras nos estames. E: vista interna do coração de *Hoplias malabaricus* após secagem em ponto crítico. F: As amostras foram metalizadas com uma mistura coloidal de ouro-paládio em aparelho Balzers® MED-010.

### **3.5. Imuno-histoquímica**

Foram utilizados ventrículos previamente fixados em solução de paraformaldeído e submetidos à rotina de inclusão em Paraplast, conforme mencionado na etapa 2.3. Os ventrículos foram seccionados com um micrótomo equipado com navalha de aço. O procedimento de imunohistoquímica teve início com a desparafinização e reidratação das seções, utilizando banhos de xilol, álcool e água. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato 10 mM ou Tris EDTA, em banho-maria a 92°C ou 98°C. Em seguida, foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% em metanol. A inibição das proteínas inespecíficas foi feita com albumina sérica bovina ou leite desnatado a 5%. Posteriormente, as seções foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário específico: CD34 Anticorpo (B-6): sc-74499. Após esse procedimento, foi realizada a incubação com o anticorpo pós-primário e o sistema de detecção com polímero Novolink™ (Leica Biosystems Newcastle Ltda), seguindo as descrições do fabricante. A revelação das ligações anticorpo-proteína foi feita com 3,3'-diaminobenzidina tetra-hidroclorida (DAB) (Novolink™, DAB, RE7270-CE, Leica Biosystems), seguida de contracoloração com hematoxilina. As etapas descritas foram intercaladas com lavagens em PBS ou TBS, e as lâminas foram analisadas em um microscópio de luz.

### **3.6. Táxons utilizados e inferências filogenéticas**

A filogenia proposta neste estudo foi inferida com base em loci ultraconservados (ultraconserved elements - UCEs) de 30 espécies pertencentes a famílias que compõem a subordem Characoidei e as ordens Siluriformes e Cypriniformes, utilizando dados previamente sequenciados disponíveis em nosso banco de dados. Infelizmente, não foi possível incluir espécies de Gymnotiformes nesta etapa, devido à ausência de espécies com UCEs descritos em nosso banco de dados. É importante ressaltar que nem todas as espécies coletadas em campo apresentaram UCEs descritos em nosso banco de dados. Nessas situações, optamos por incluir espécies filogeneticamente próximas às coletadas para a

composição da árvore, levando em consideração a semelhança morfológica do ventrículo entre as espécies do mesmo gênero.

### **3.7. Bioinformática**

Uma matriz de caracteres morfológicos foi elaborada com base nos resultados apresentados na Tabela 1. Todas as análises, desde a montagem inicial da matriz, foram realizadas utilizando o software Phyluce (FAIRCLOTH, 2016). As técnicas de extração de DNA e sequenciamento utilizadas para obter os UCEs estão descritas em Roxo et al. (2019). Inicialmente, foram realizadas etapas de pré-processamento dos dados. As contaminações nos adaptadores, bases de baixa qualidade e sequências contendo bases ambíguas foram removidas utilizando o software Illumiprocessor (FAIRCLOTH, 2013; <https://github.com/faircloth-lab/illumiprocessor>). Em seguida, os "reads" foram agrupados em "contigs" usando o alinhador Velvet do software VelvetOptimiser (<https://github.com/Victorian-Bioinformatics-Consortium/VelvetOptimiser>). Após a geração dos "contigs", utilizamos um programa Python (match\_contigs\_to\_probes.py) para alinhar os "contigs" específicos de cada espécie ao nosso conjunto de sondas-UCE. Em seguida, o programa "get\_match\_counts.py" foi utilizado para consultar o banco de dados e gerar arquivos "FASTA" para os loci de UCEs que foram identificados em todos os táxons. Em seguida, utilizamos um programa personalizado em Python (seqcap\_align\_2.py) para alinhar os "contigs" utilizando o algoritmo de alinhamento MUSCLE (EDGAR, 2004) e para aparar as extremidades e regiões internas, descartando regiões amplamente variáveis e partes de regiões conservadas. Por fim, foram realizadas análises filogenéticas, levando em consideração a presença de quantidades variáveis de dados ausentes (missing data). Na matriz final, foram mantidos 75% dos UCEs que estavam presentes na matriz completamente alinhada.

### **3.8. Análise filogenética da matriz concatenada**

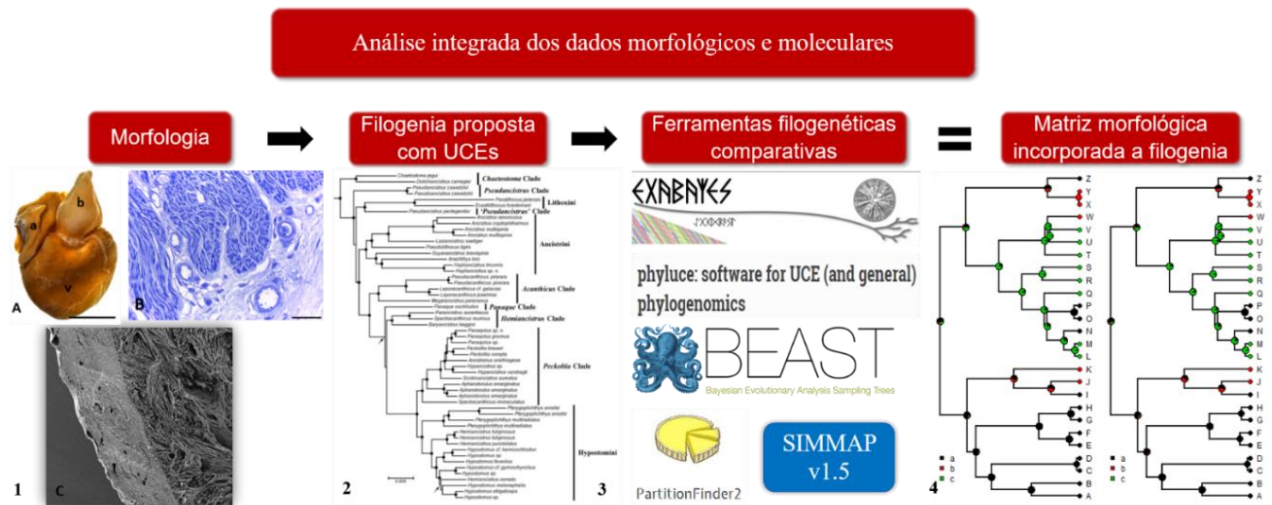
O conjunto de dados concatenados foi analisado utilizando o método da máxima verossimilhança no programa RAxML v8.019 (STAMATAKIS, 2014), executado em um servidor Zungaro do IBB-UNESP, equipado com uma CPU 2 X

10 de 256GB. Para as análises de verossimilhança, foi utilizado o modelo GTR+G aplicado à matriz completa sem partições. Foram realizadas cinco análises alternativas para buscar a melhor árvore, sendo utilizada uma árvore de parcimônia para iniciar cada busca. O alinhamento concatenado também foi utilizado para a realização de réplicas de "bootstraps" usando a função "autoMRE" para o critério "extended majority-rule consensus tree" disponível no programa RAxML v8 (STAMATAKIS, 2014), a fim de avaliar o suporte dos nós individuais. Essa análise de máxima verossimilhança foi realizada em uma matriz com 75% de completude e sem partições. Além disso, foram realizadas análises Bayesianas dos alinhamentos concatenados sem partições utilizando o programa ExaBayes (ABERER et al., 2014). Foram executadas duas análises independentes, cada uma com duas cadeias (uma fria e uma aquecida), durante 1.000.000 de gerações. O modelo GTR+G foi utilizado para diferentes matrizes complementares e análises de alinhamento aparados. A cada 100 gerações, foi amostrado um espaço nas árvores para obter um total de 20.000 árvores. A estimativa dos parâmetros e os valores ESS foram analisados no programa Tracer v1.6 (RAMBAUT et al., 2014). Após verificar a convergência dos resultados, as últimas 5.000 árvores foram amostradas.

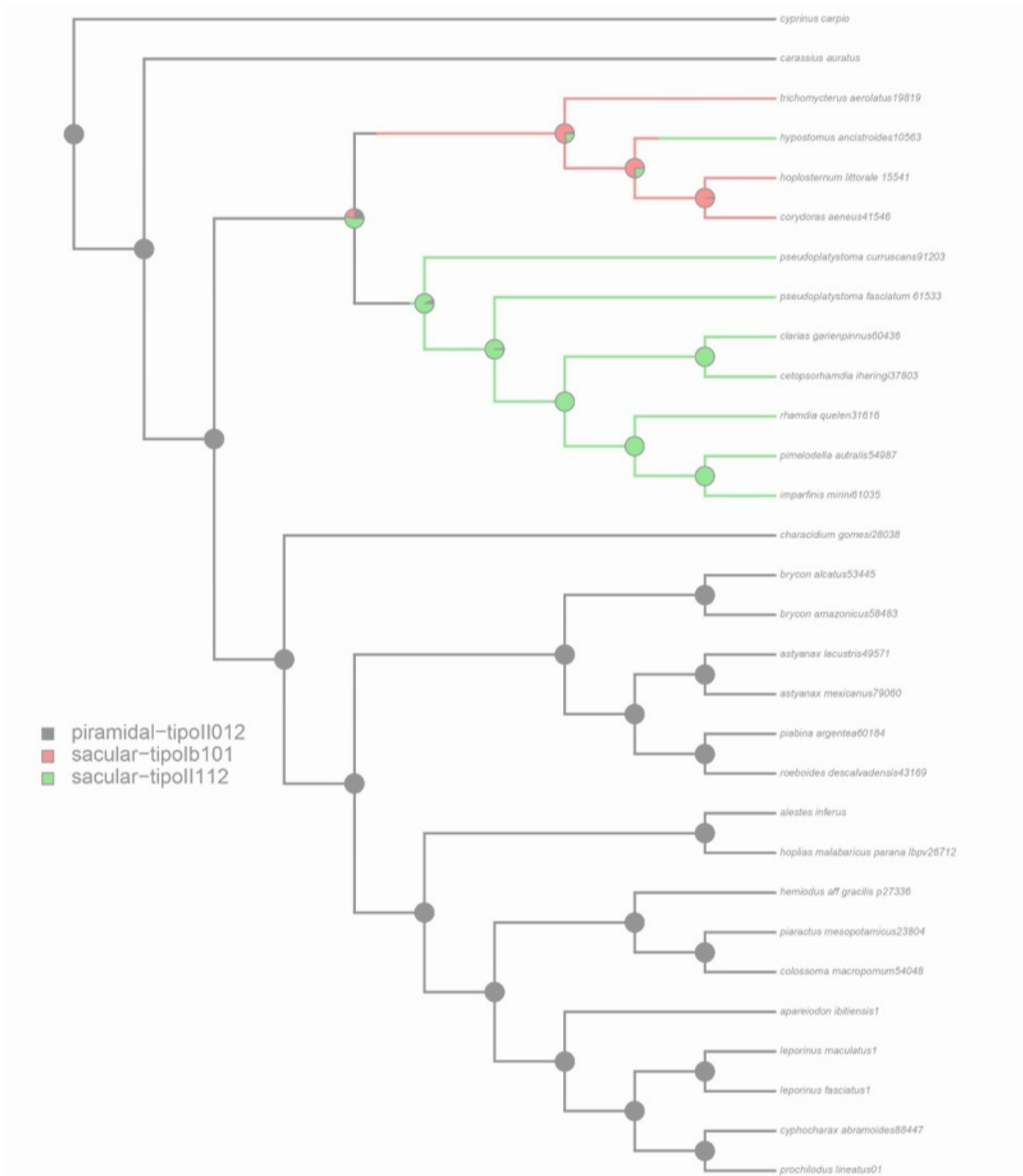
### **3.9. Estimando a morfologia ventricular**

Os caracteres morfológicos do ventrículo relacionados à anatomia externa, organização do miocárdio e estado da vascularização coronária foram obtidos utilizando técnicas morfológicas descritas nos itens 3.2-4. A análise da evolução dessas características morfológicas ao longo da filogenia de Otophysi foi realizada utilizando a função "make.simmap" no pacote "phytools v0.3.10" do software R. Nessa análise, foram testadas diferentes combinações possíveis entre os caracteres morfológicos discretos (conforme mostrado na Tabela 1). Foram realizadas 1000 simulações estocásticas no mapeamento dos caracteres morfológicos, utilizando a técnica de "stochastic character map simulations". Também foram testados diferentes modelos de evolução de caracteres discretos utilizando a função "fitDiscrete" no pacote "geiger" do software R. Esses modelos incluíram o "equal-rates (ER)", "symmetric (SYM)", "all-rates-different (ARD)" e

"meristic macroevolutionary". Toda a metodologia proposta neste estudo está resumida na Figura 12.



**Fig.12: Fluxograma exemplificando a metodologia apresentada.** Os caracteres morfológicos do ventrículo (1) foram incorporados em uma filogenia proposta com UCEs (2) e analisados por meio de métodos filogenéticos comparativos (3, 4).



## 4. Resultados e Discussão

#### 4.1. Morfologia do Ventrículo

Os corações de todas as espécies descritas neste estudo foram compostos por seis componentes anatômicos dispostos em série: seio venoso, átrio, segmento atrioventricular, ventrículo, bulbo arterioso e cone arterioso. Os ventrículos apresentaram a seguinte composição histológica: epicárdio, espaço subepicárdico, miocárdio, espaço subendocárdico e endocárdio.

Em relação à anatomia ventricular, é importante ressaltar que, apesar de semelhanças morfológicas ocorrerem e permitirem classificações como "piramidal", "sacular" e "tubular", existem diferenças de caráter quantitativo, como tamanho, angulação dos ápices, espessura da camada compacta e número de artérias coronárias entre as espécies, conferindo a cada ventrículo características particulares. Essas características possuem uma correlação funcional direta com o desempenho do ventrículo e podem sofrer alterações de acordo com fatores como temperatura, crescimento e exercício, devido à ampla plasticidade morfológica e fisiológica desta câmara (GAMPERL; FARRELL, 2004; POPPE et al., 2004; DIMITRIADI et al., 2021). Um exemplo de plasticidade morfológica do ventrículo relacionada ao crescimento da espécie pode ser observado na figura 15B.

Um estudo realizado em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) demonstrou que a temperatura da água em estágios iniciais de desenvolvimento pode modificar a morfologia ventricular, com uma maior temperatura induzindo a formação de ventrículos com ápices mais arredondados (DIMITRIADI et al., 2021). Além disso, diferenças morfológicas expressivas podem ocorrer entre exemplares selvagens e de piscicultura, como observado no ventrículo de salmonídeos (POPPE et al., 2004). Assim, neste estudo, discutimos a morfologia e evolução do ventrículo sob uma perspectiva qualitativa. Para isso, utilizamos as definições de Santer et al. (1983) e Santer (1985) para a anatomia externa, Icardo (2017) para definições a respeito do arranjo do miocárdio (ou seja, mioarquitetura) e Tota et al. (1983) para a classificação do ventrículo em quatro diferentes tipos, com base na mioarquitetura e vascularização. É importante ressaltar que a orientação das fibras que compõem as camadas compacta e esponjosa leva em consideração o plano de secção no qual os ventrículos foram seccionados.

Todos os exemplares de Characoidei observados, independentemente da posição filogenética, apresentaram um ventrículo piramidal associado a um miocárdio misto e vascularização restrita à camada compacta. O formato dos ventrículos pôde ser descrito como uma pirâmide invertida com ângulos bem definidos. O átrio e o bulbo arterioso estiveram posicionados na superfície cranial do ventrículo, comumente ocorrendo aposição lateral entre as câmaras (Figs. 13B, C; 14B, C; 15B, C; 16B; 17B, C; 18B; 19B, C; 21B, C). As variações anatômicas ocorreram somente em relação à angulação dos ápices entre as espécies, não havendo alterações no formato geral e posicionamento do átrio e bulbo arterioso.

Em relação à mioarquitetura, a camada compacta apresentou uma diferença visível em espessura, porém organização semelhante entre as espécies. Essa camada foi constituída por fibras musculares organizadas em feixes com orientação longitudinal e circular (ou seja, camada compacta composta). Entretanto, tanto a orientação dos feixes quanto a espessura da camada compacta não foram constantes ao longo do ventrículo em nenhuma das espécies, sendo visivelmente mais espessa nas laterais e mais delgada no ápice. A camada compacta também demonstrou vascularização coronária em todos os ventrículos observados (Figs. 13E; 14D; 15D; 16D; 17D; 18C; 20D; 21D).

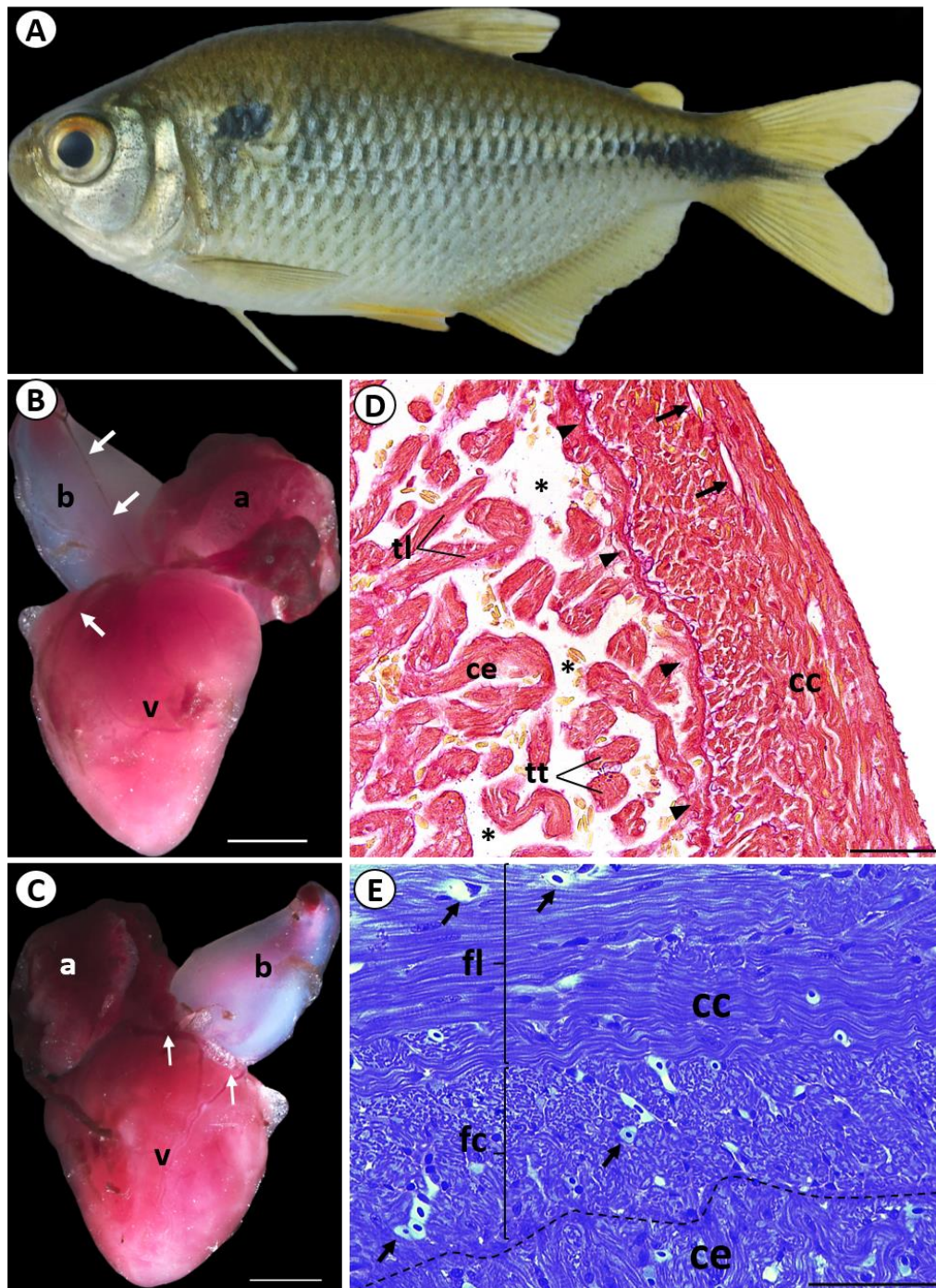
A camada esponjosa apresentou fibras musculares organizadas em trabéculas com orientação longitudinal e transversal em todas as espécies. Nenhum arranjo específico das trabéculas foi identificado (Figs. 14D; 15D; 17D; 18C). Foram observados espaços intertrabeculares (ou seja, lacunas) aumentando a superfície de contato entre o miocárdio e o sangue presente no lúmen (Figs. 14D; 15D; 17D; 18C). Por meio da coloração de Picrosirius, detectamos um arco de colágeno entre as camadas compacta e esponjosa. Entretanto, a quantidade de colágeno e a continuidade do arco foram variáveis (Figs. 13D; 14E; 15E; 16E; 17E; 19; 20E; 21F).

O colágeno atua como um componente juncional e permite maior aderência entre as camadas do miocárdio, auxiliando para que ambas atuem de forma coordenada durante a sístole (Tota, 1978; Icardo, 2012). Os resultados de microscopia eletrônica demonstraram que as trabéculas da camada esponjosa dobram suas extremidades para realizar uma conexão paralela aos feixes da

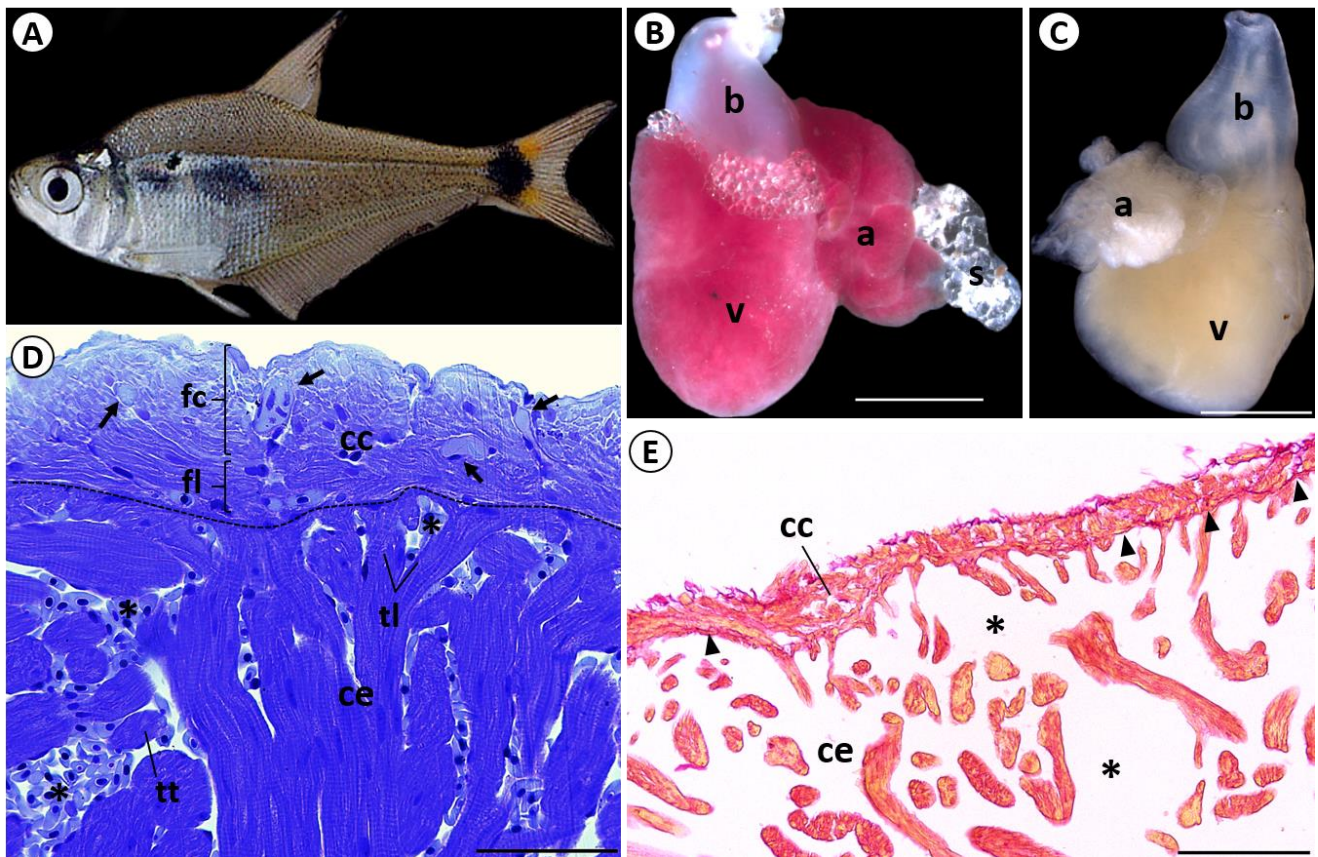
camada compacta, aumentando a superfície de contato (Fig. 37A-D). A junção dessas trabéculas terminais aparenta formar uma camada delgada de células que, juntamente com o colágeno da matriz extracelular e outros componentes juncionais (Pieperhoff et al., 2009), mantêm a aderência necessária para o funcionamento sincronizado de ambas as camadas durante a sístole (Tota, 1978; Icardo, 2012).

As artérias coronárias tiveram origem a partir das artérias hipobranquiais, formadas por junções das artérias branquiais eferentes. A partir dessas artérias, originaram-se os ramos coronários direito e esquerdo, que se uniram e alcançaram o coração pela superfície ventral do bulbo arterioso. A artéria coronária única apresentou um trajeto descendente, ramificando-se na superfície do ventrículo (Figs. 13B, C; 15C; 16C; 17B; 21C). As ramificações coronárias penetraram a parede ventricular até o nível da camada compacta.

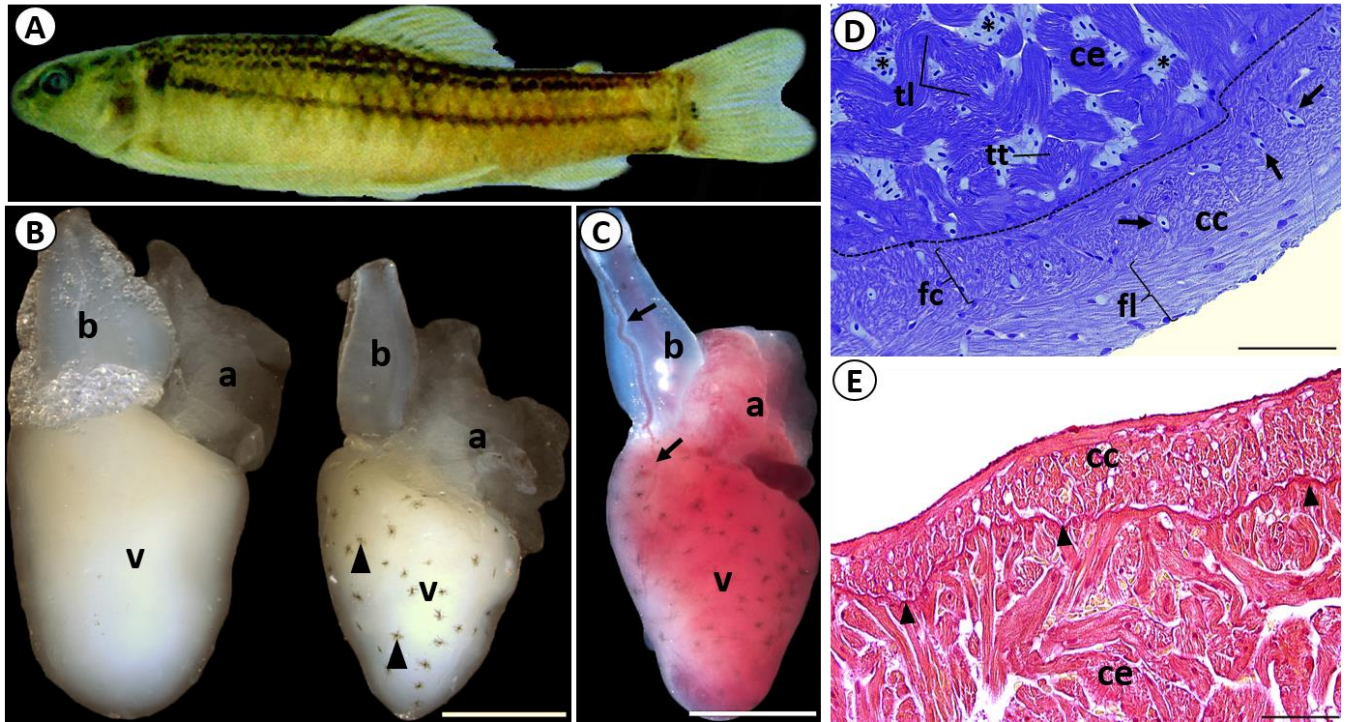
Assim, considerando a presença de miocárdio misto e vascularização restrita à camada compacta, foi possível classificar o ventrículo dos Characoidei estudados como tipo II, segundo Tota et al. (1983). Vasos coronários não puderam ser observados por técnicas de histologia básica em nenhuma das espécies. Comparativamente, os resultados obtidos neste estudo são semelhantes a outros Characoidei, como em representantes da família Serrasalminidae (Simões et al., 2002) e Erythrynidae (Gardinal et al., 2018). Unindo os resultados do presente estudo com informações da literatura, dados sobre a morfologia ventricular estão presentes em espécies representantes de 11 das 24 famílias de Characoidei (Nelson, 2016). Assim, tratando qualquer generalização com cautela, é possível inferir que ventrículos piramidais de tipo II, com camada compacta formada por feixes musculares em duas orientações, que nomeamos "compacta composta", aparentam ser o padrão morfológico neste grupo até o momento.



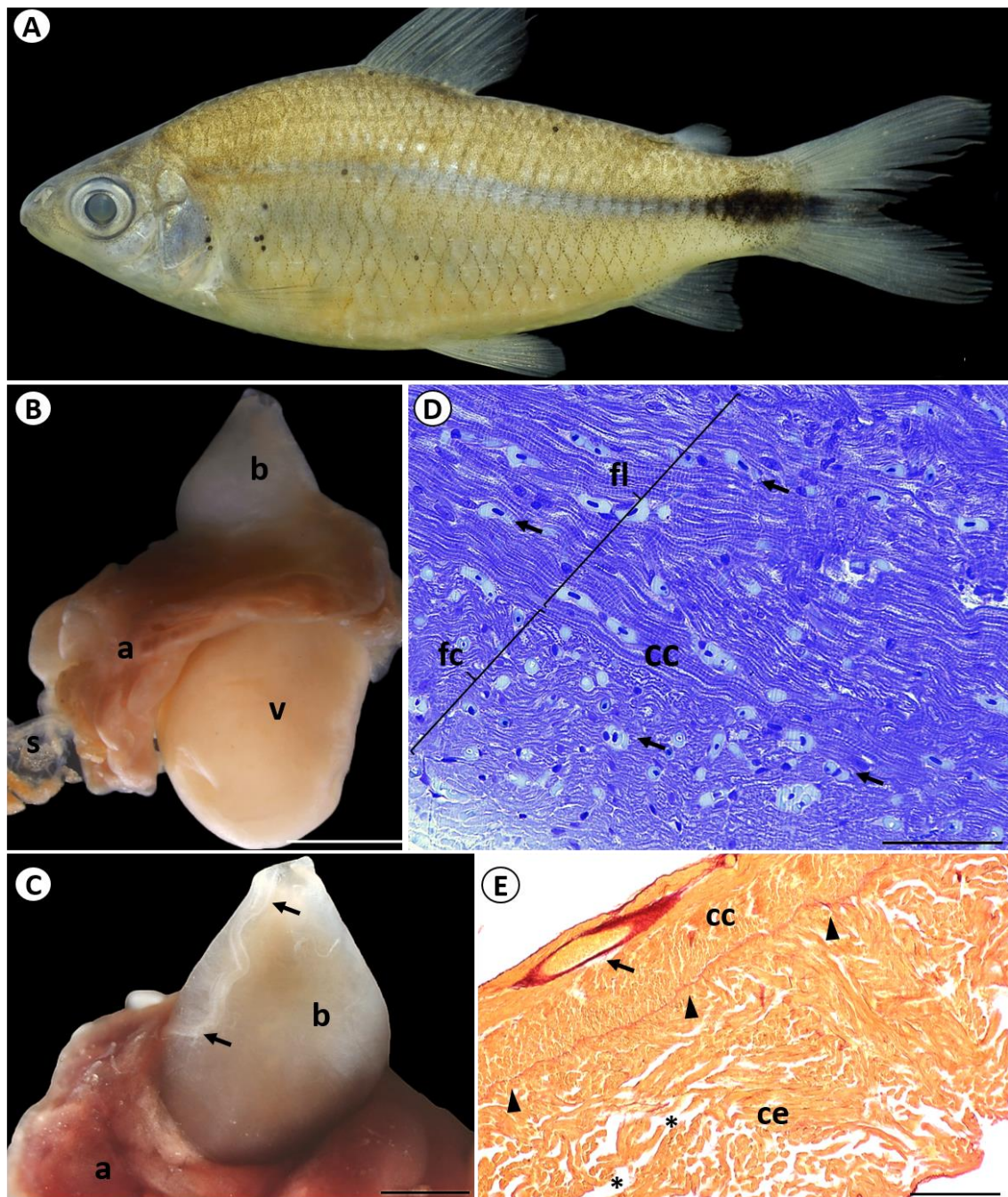
**Fig. 13: Anatomia e histologia do ventrículo de *Astyanax lacustris*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista lateral esquerda (B) e direita (C) evidenciando o ventrículo piramidal e artérias coronárias superficiais (setas brancas). D: Secção histológica do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Um arco de colágeno (cabeças de seta) separa as camadas compacta e esponjosa. A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de vasos coronários (setas) na camada compacta e a presença de lacunas entre as trabéculas da camada esponjosa (asteriscos). E: Secção semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes musculares em orientação longitudinal e circular. Note a presença de vasos coronários (setas). A linha pontilhada mostra o limite entre as camadas. **Colorações:** D: picosirius; E: azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barra de escala:** B e C: 0,1cm; D e E: 50µm.



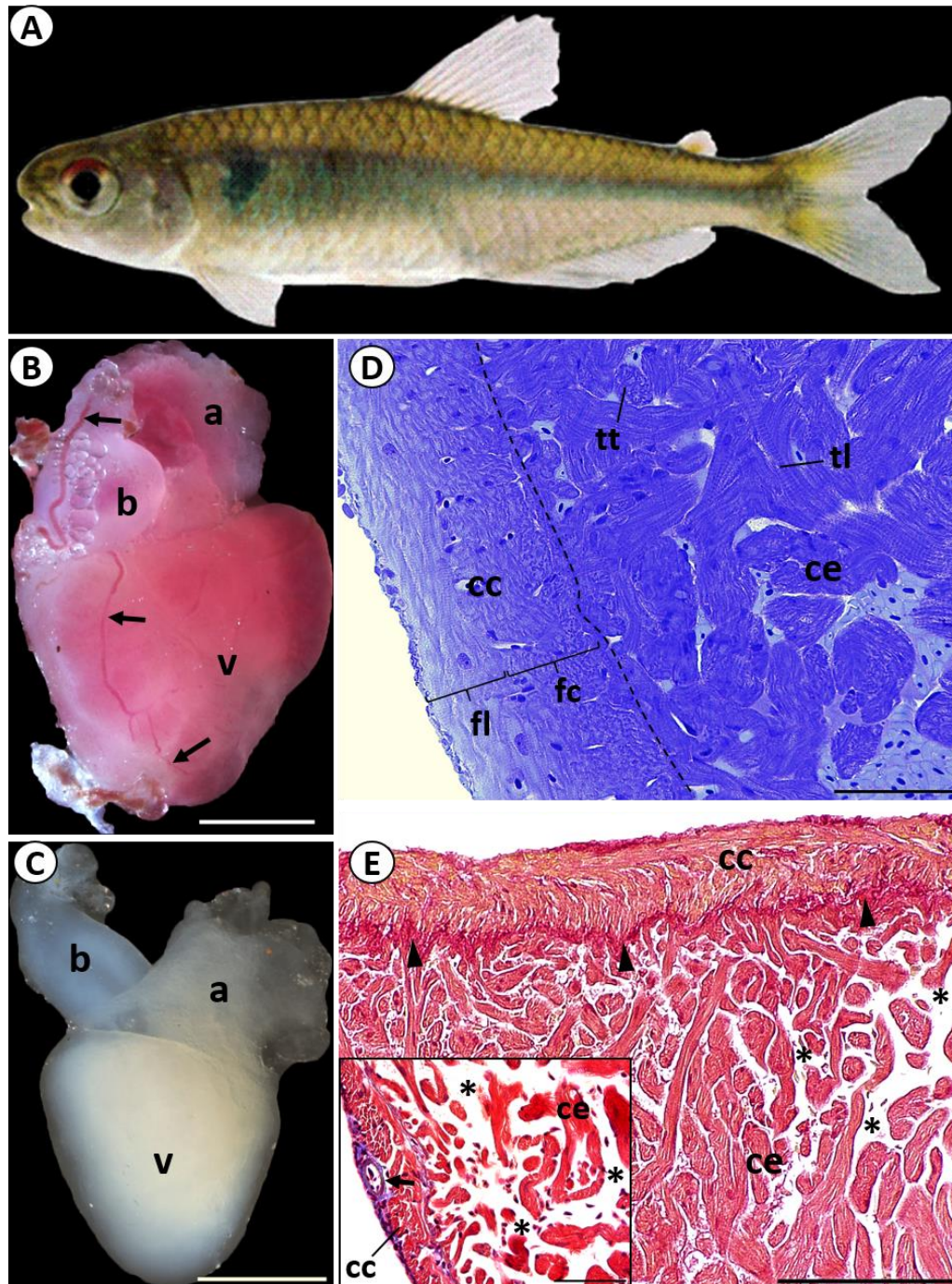
**Fig. 14: Anatomia e histologia do ventrículo de *Roeboides descavadensis*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista lateral esquerda (B) e direita (C) evidenciando o ventrículo piramidal. D: Secção semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. A camada compacta é composta por feixes musculares em orientação longitudinal e circular. Note a presença de vasos coronários na compacta (setas). A linha pontilhada mostra o limite entre as camadas compacta e esponjosa. A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas preenchidas por sangue (asteriscos). E: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). **Colorações:** D: azul de toluidina; E: picrossírus. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; s: seio venoso; v: ventrículo. **Barras de escala:** B e C: 0,1cm; D e E: 50µm.



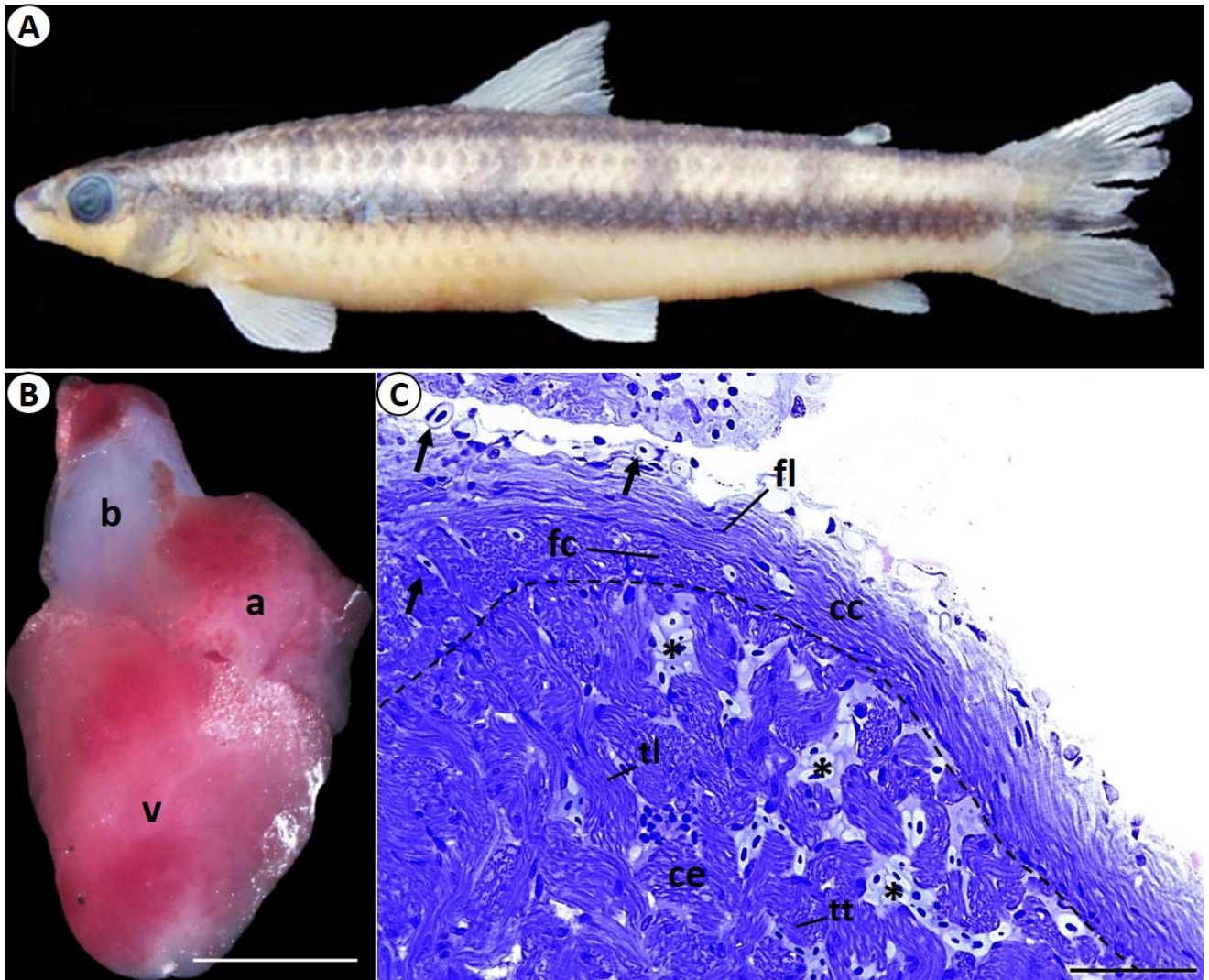
**Fig. 15: Anatomia e histologia do ventrículo de *Characidium gomesi*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração fixado em vista lateral esquerda. Note a alteração do formato piramidal e perda de pigmentação (cabeças de seta) entre as fases juvenil (direita) e adulto (esquerda). C: Anatomia do coração natural em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal, a presença de pigmentação e artéria coronária na superfície do bulbo (seta). D: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes em orientação longitudinal e circular na camada compacta e a presença de vasos coronários (seta). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas preenchidas por sangue (asteriscos). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. E: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas. **Colorações:** D: azul de toluidina; E: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B e C: 0,1cm; D e E: 50  $\mu$ m.



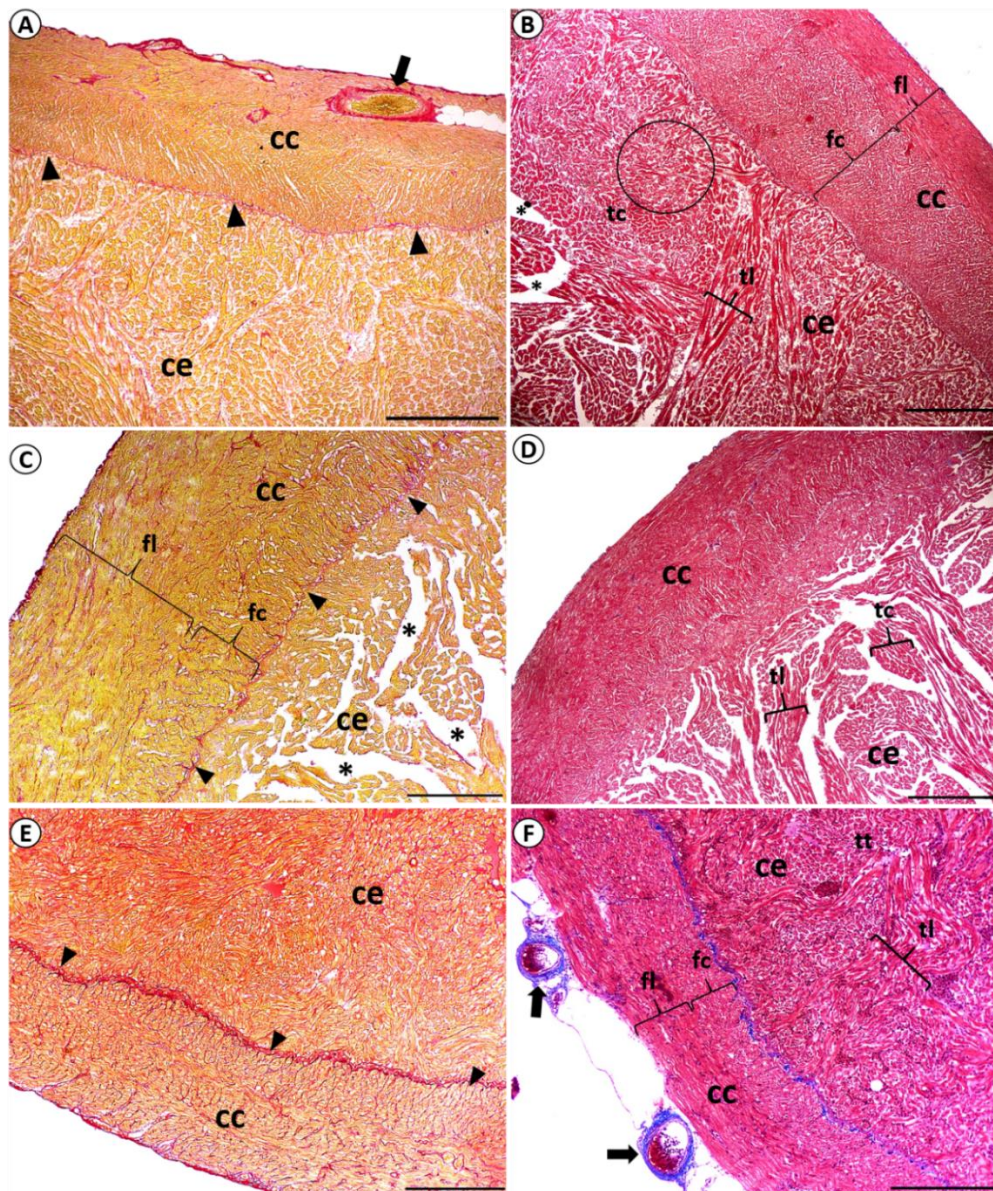
**Fig. 16: Anatomia e histologia do ventrículo de *Cyphocharax modestus*.** A: Foto do espécime em vista lateral, obtida a partir de Santos et al. (2016). B: Anatomia do coração fixado em vista dorsal evidenciando o ventrículo piramidal. Note a aposição entre o átrio e o ventrículo. (C) Vista dorsal do bulbo arterioso evidenciando artérias coronárias superficiais (setas). D: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes longitudinais e circulares. Note a presença de vasos coronários (setas). E: Secção histológica do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Um arco de colágeno (cabeças de seta) separa ambas as camadas. Note a presença de vasos coronários na camada compacta (setas) e lacunas entre as trabéculas na esponjosa (asteriscos). **Colorações:** D: azul de toluidina; E: picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; s: seio venoso; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,2cm; C: 0,1cm; D e E: 50µm.



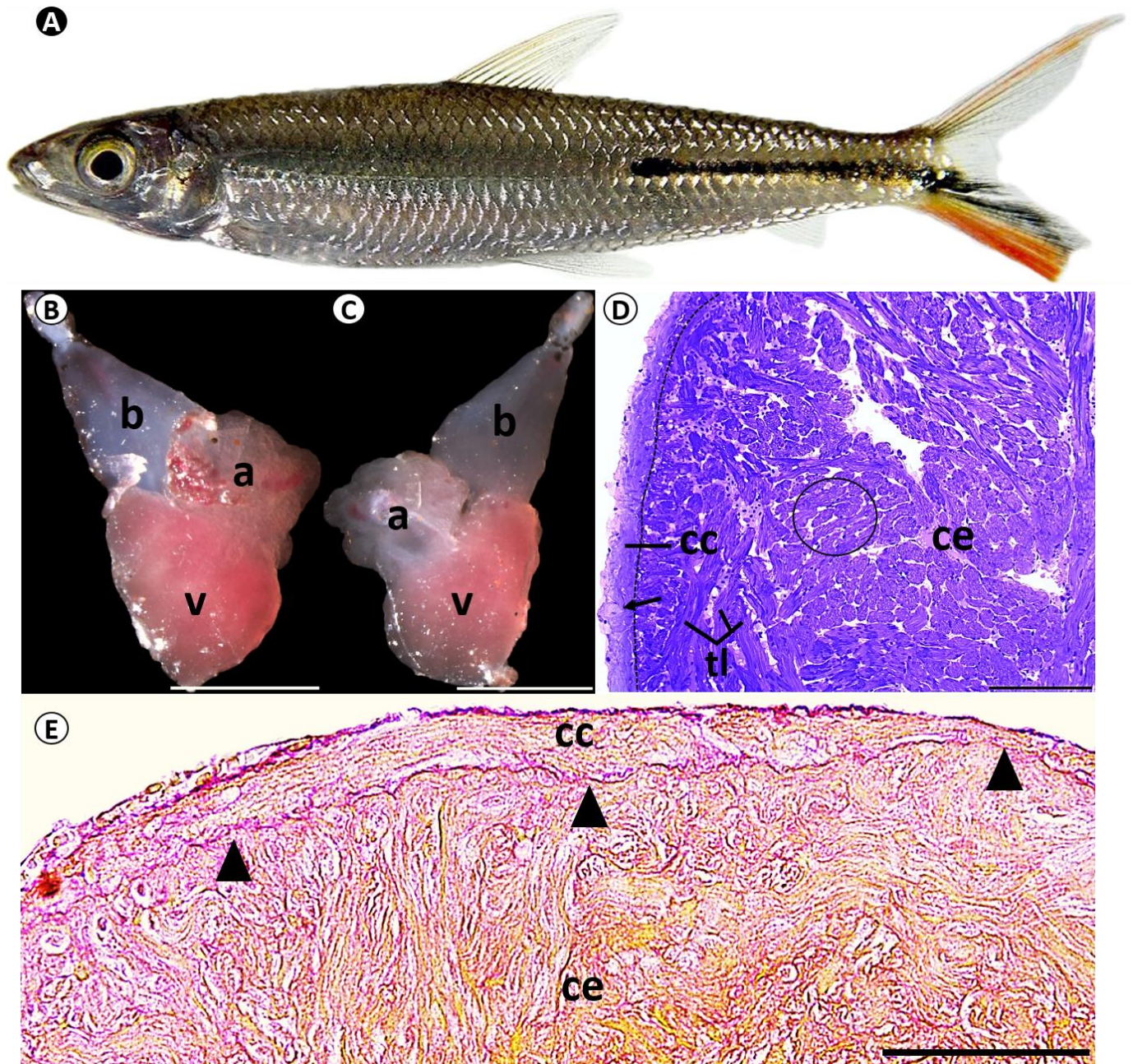
**Fig. 17: Anatomia e histologia do ventrículo de *Piabina argentea*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista ventral (B) e esquerda (C) evidenciando o ventrículo piramidal e artérias coronárias superficiais (setas pretas). D: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares compondo a camada compacta. A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. E: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas. Note a presença de vasos coronários na camada compacta (inset, seta) e presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). **Colorações:** D: Azul de toluidina; E: Picrosirius; E (Inset): Tricrômico de Masson. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B e C: 0,1cm; D, E, E(Inset): 50µm.



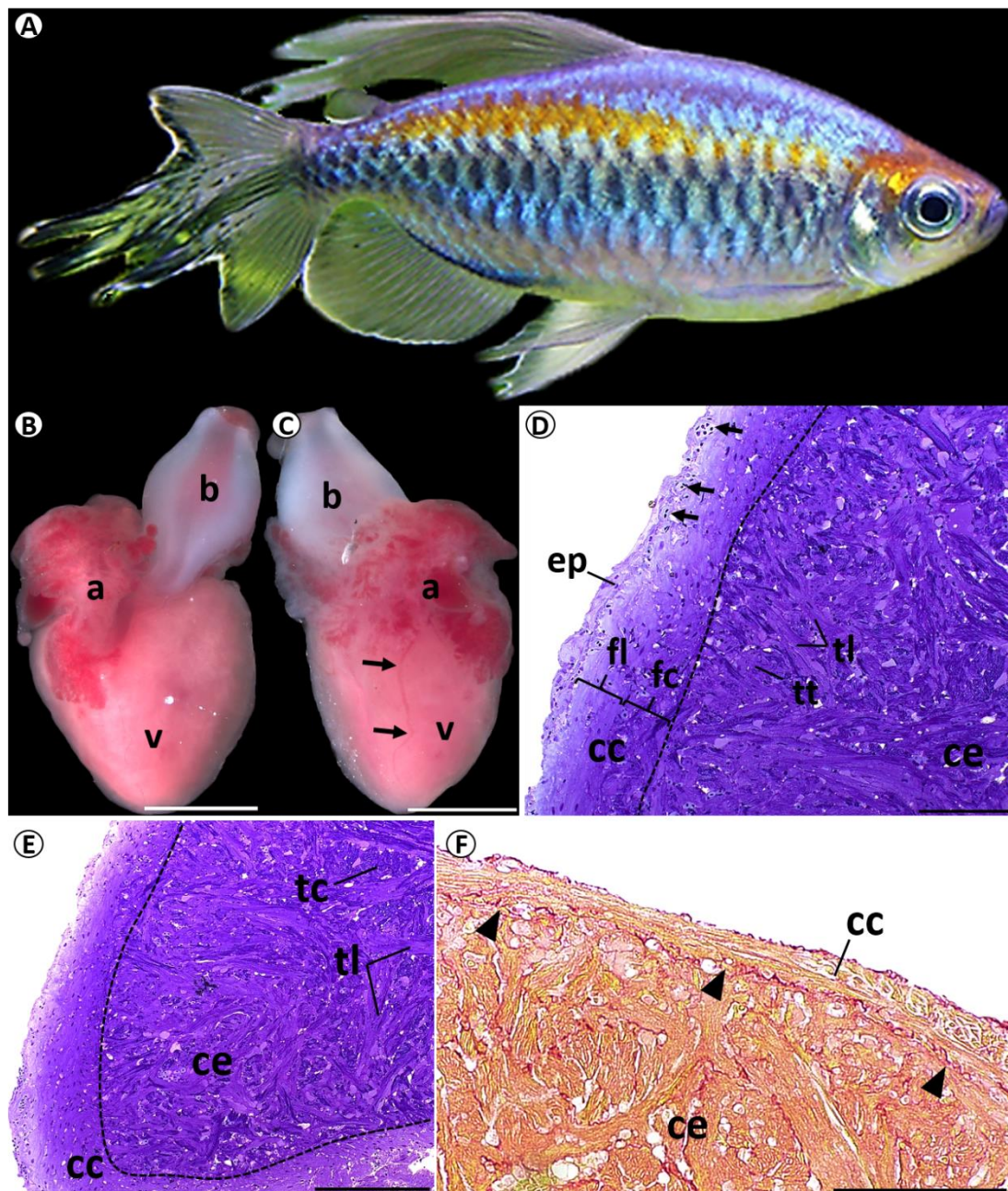
**Fig. 18: Anatomia e histologia do ventrículo de *Apareiodon affinis*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a aposição entre o átrio e o bulbo arterioso. C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares na camada compacta e a presença de vasos coronários (setas). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. **Coloração:** C: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 20  $\mu$ m.



**Fig. 19: Histologia dos ventrículos de *MegaMegaleporinus obtusidens*, *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*.** A: Secção histológica do ventrículo de *M. obtusidens* evidenciando o arco de colágeno entre as camadas compacta e esponjosa (cabeças de seta). Note a presença de artéria coronária na camada compacta (seta). B: Secção histológica do ventrículo de *M. obtusidens* evidenciando a camada compacta formada por feixes em orientação longitudinal e circular. A camada esponjosa é formada por trabéculas em orientação longitudinal e transversal (círculo). Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). C: Secção histológica do ventrículo de *P. lineatus* evidenciando o arco de colágeno entre as camadas compacta e esponjosa (cabeças de seta). A camada compacta formada é formada por feixes em orientação longitudinal e circular. Note a presença de lacunas entre as trabéculas da camada esponjosa (asteriscos). D: Secção histológica do ventrículo de *P. lineatus* evidenciando as trabéculas da camada esponjosa em orientação longitudinal e transversal. E: Secção histológica do ventrículo de *B. orbignyanus* evidenciando o arco de colágeno entre as camadas compacta e esponjosa (cabeças de seta). F: Secção histológica do ventrículo de *B. orbignyanus* evidenciando a camada compacta formada por feixes em orientação longitudinal e circular. A camada esponjosa é formada por trabéculas em orientação longitudinal e transversal (círculo). Note a presença de artérias coronárias na região do subepicárdio (setas). **Colorações:** A, C, E: Picrosirius; B, D, F: Tricrômico de Masson. **Abreviações:** cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais. **Barras de Escala:** 200  $\mu$ m.



**Fig. 20: Anatomia e histologia do ventrículo de *Hemiodus gracilis*** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista lateral esquerda (B) e direita (C) evidenciando o ventrículo piramidal. D: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a camada compacta delgada e pouco evidente apresentando vascularização evidente (seta). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação transversal (circulo) e longitudinal. E: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas compacta e esponjosa. Colorações: D: azul de toluidina; E: Picrosirius: Abreviações: a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; tl: trabéculas longitudinais; v: ventrículo. Barras de escala: B e C: 0,1cm; D e E: 100µm.



**Fig. 21: Anatomia e histologia do ventrículo de *Phenacogrammus interruptus*** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista lateral direita (B) e esquerda (C) evidenciando o ventrículo piramidal e artérias coronárias superficiais (setas). D e E: Secção histológica semifina do ventrículo em maior (D) e menor (E) aumento evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares na camada compacta e a presença de vasos coronários miocárdicos (setas). F: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas. **Colorações:** D e E: azul de toluidina; F: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B e C: 0,1cm; D: 100µm; E: 200µm; F: 100 µm.

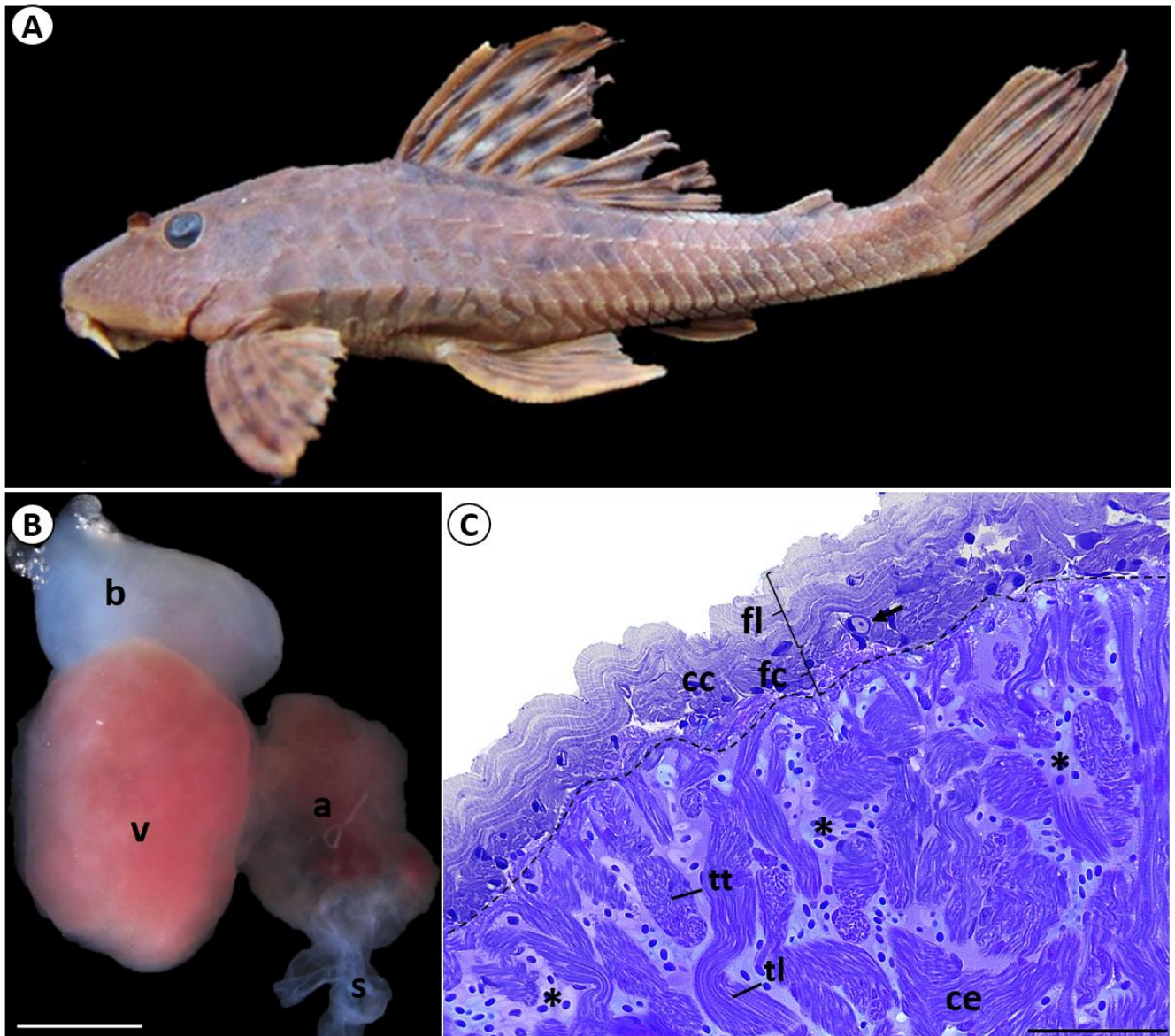
O cenário descrito acima é diferente nas espécies estudadas da ordem Siluriformes, onde se observou maior variabilidade morfológica do ventrículo. As espécies apresentaram ventrículo predominantemente sacular, com mioarquitetura variando entre inteiramente trabeculada e mista, com vasos coronários restritos ao epicárdio (Tipo Ib) ou restritos à camada compacta (Tipo II). O formato sacular, de forma geral, pode ser descrito como arredondado e achatado dorsoventralmente, sem bordas definidas. O bulbo arterioso esteve localizado na superfície cranial do ventrículo, enquanto o átrio esteve na superfície dorsal, com pouca ou nenhuma aposição entre as câmaras (Figs. 22B; 23B; 24B, C; 25B; 27B; 28B; 29B, C; 30B; 31B;). *Cambeva diabola* demonstrou uma morfologia atípica em relação aos três formatos descritos por Santer et al., (1983), seu ventrículo apresentou-se parcialmente arredondado com angulações pouco evidentes nas bordas, o que possibilitaria sua classificação como sacular, porém demonstrou posicionamento do átrio e bulbo arterioso na superfície cranial do ventrículo, semelhante ao descrito em ventrículos piramidais (Figs. 20B).

Em relação à mioarquitetura, com exceção de *Corydoras aeneus*, *Hoplosternum littorale* e *Cambeva diabola*, as espécies demonstraram ventrículos associados a um miocárdio misto com vascularização restrita à camada compacta, sendo classificados como tipo II. A origem e distribuição das artérias coronárias foram semelhantes ao observado em Characoidei (Figs. 23B; 24B; 27B; 28B; 29B, C; 30B;). Nestas espécies, a camada compacta apresentou feixes musculares em orientação longitudinal e circular (compacta composta) (Figs. 22C; 23E, F; 24D; 27C; 28C; 29D, E; 30C;). Essa organização ocorreu mesmo em camadas compactas mais discretas, como em *Hypostomus ancistroides* (Fig. 22C). Por outro lado, o ventrículo de *Corydoras aeneus*, *Hoplosternum littorale* e o ventrículo "sacular" atípico de *Cambeva diabola* não apresentaram compactação, sendo inteiramente trabeculados, com vasos coronários restritos ao espaço subepicárdico, podendo ser classificados como tipo Ib (Figs. 25D; 26D; 31C, D;).

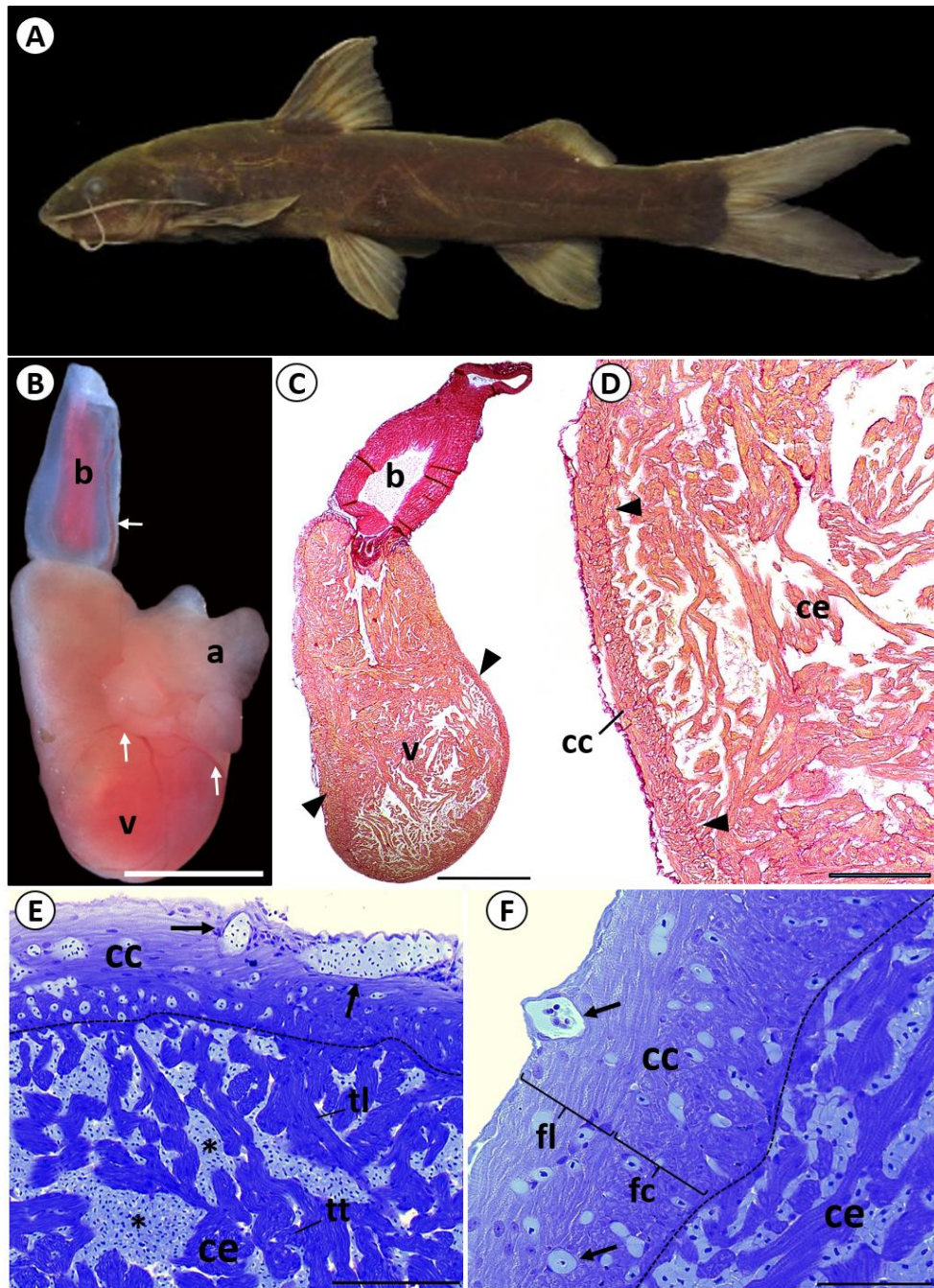
Assim como em Characoidei, não observamos vasos coronários na camada esponjosa de nenhuma espécie. A camada esponjosa foi semelhante entre os Siluriformes, com fibras musculares organizadas em trabéculas com orientação longitudinal e transversal e espaços intertrabeculares evidentes (Figs. 22C; 23E; 24D; 25D; 26D; 27C; 31C;). Em espécies de miocárdio misto, o arco de colágeno

entre as camadas compacta e esponjosa também foi identificado (Figs. 23C, D; 27D, E; 29F; 30D). Em miocárdios inteiramente trabeculados, o arco de colágeno é ausente (Figs. 25C; 26C, E, F; 31E).

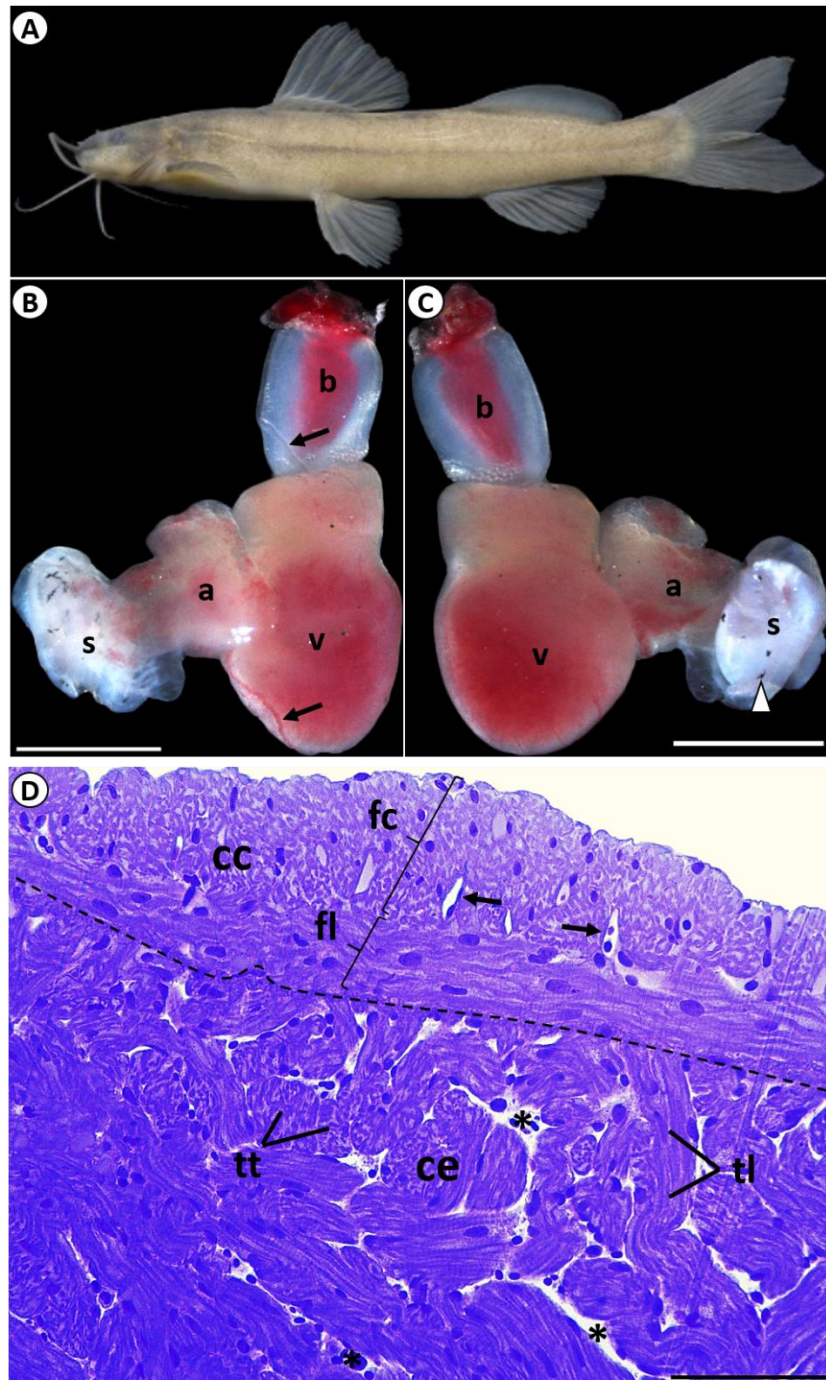
Comparativamente, o ventrículo sacular observado no presente estudo também ocorreu em espécies descritas na literatura, como *Pterodoras granulosus* (Valenciennes, 1821) (Gardinal et al., 2018) e o bagre africano *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Simões et al., 2002). Essas espécies também apresentaram o ventrículo tipo II. Quaisquer variações atípicas do formato sacular, como o observado em *Cambeva diabolus*, ainda não foram descritas. Considerando os resultados obtidos, é possível inferir que o ventrículo piramidal foi característico em Characoidei, enquanto ventrículos predominantemente saculares foram característicos em Siluriformes. O tipo II foi predominante em ambas as ordens, em geral, com a camada compacta apresentando uma arquitetura composta, com duas diferentes orientações dos feixes musculares.



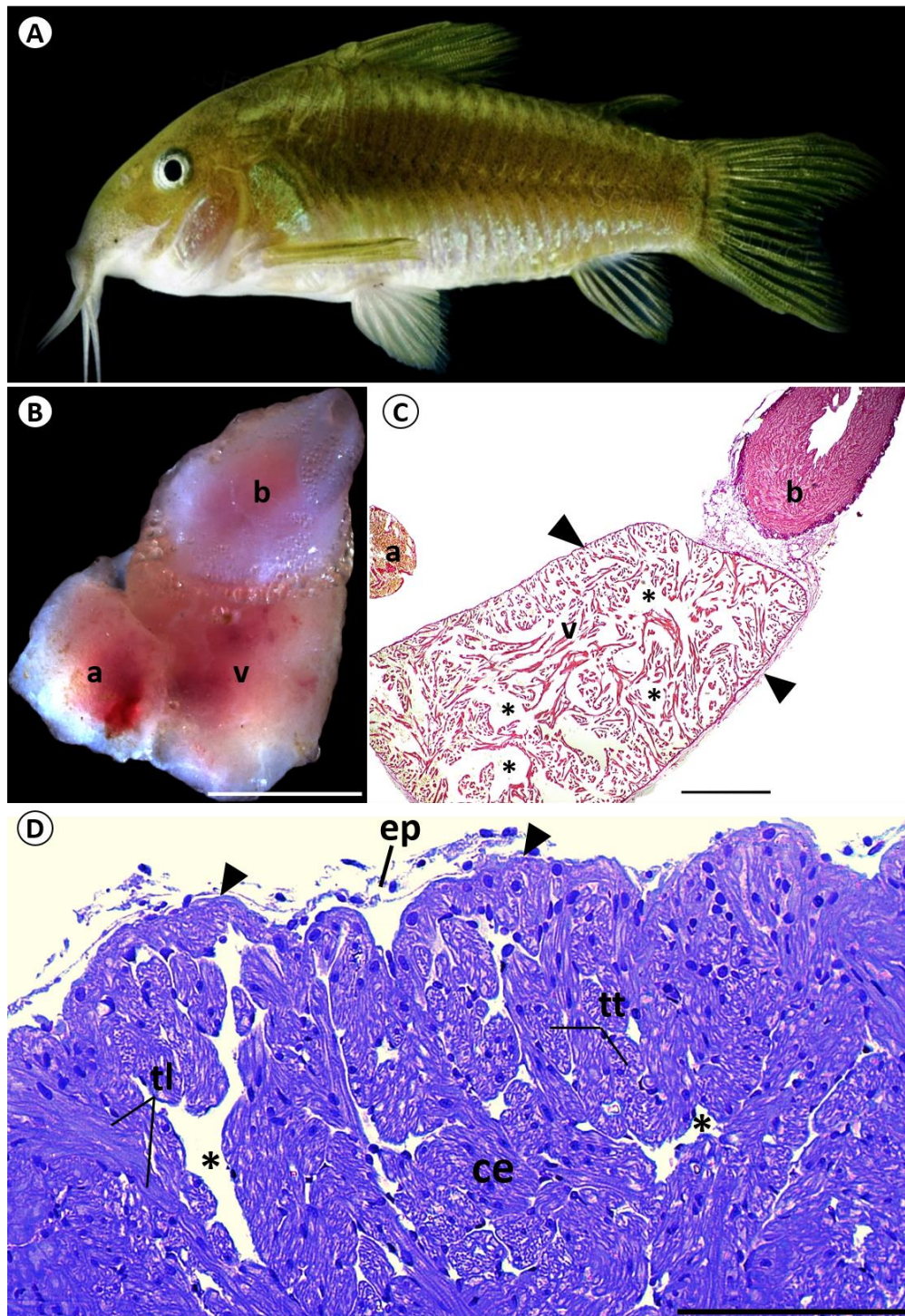
**Fig. 22: Anatomia e histologia do ventrículo de *Hypostomus ancistroides*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular. Note a ausência de aposição entre o átrio e o bulbo arterioso. C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares na compacta e a presença de artéria coronária (seta). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. **Coloração:** C: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; s: seio venoso; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 50  $\mu$ m.



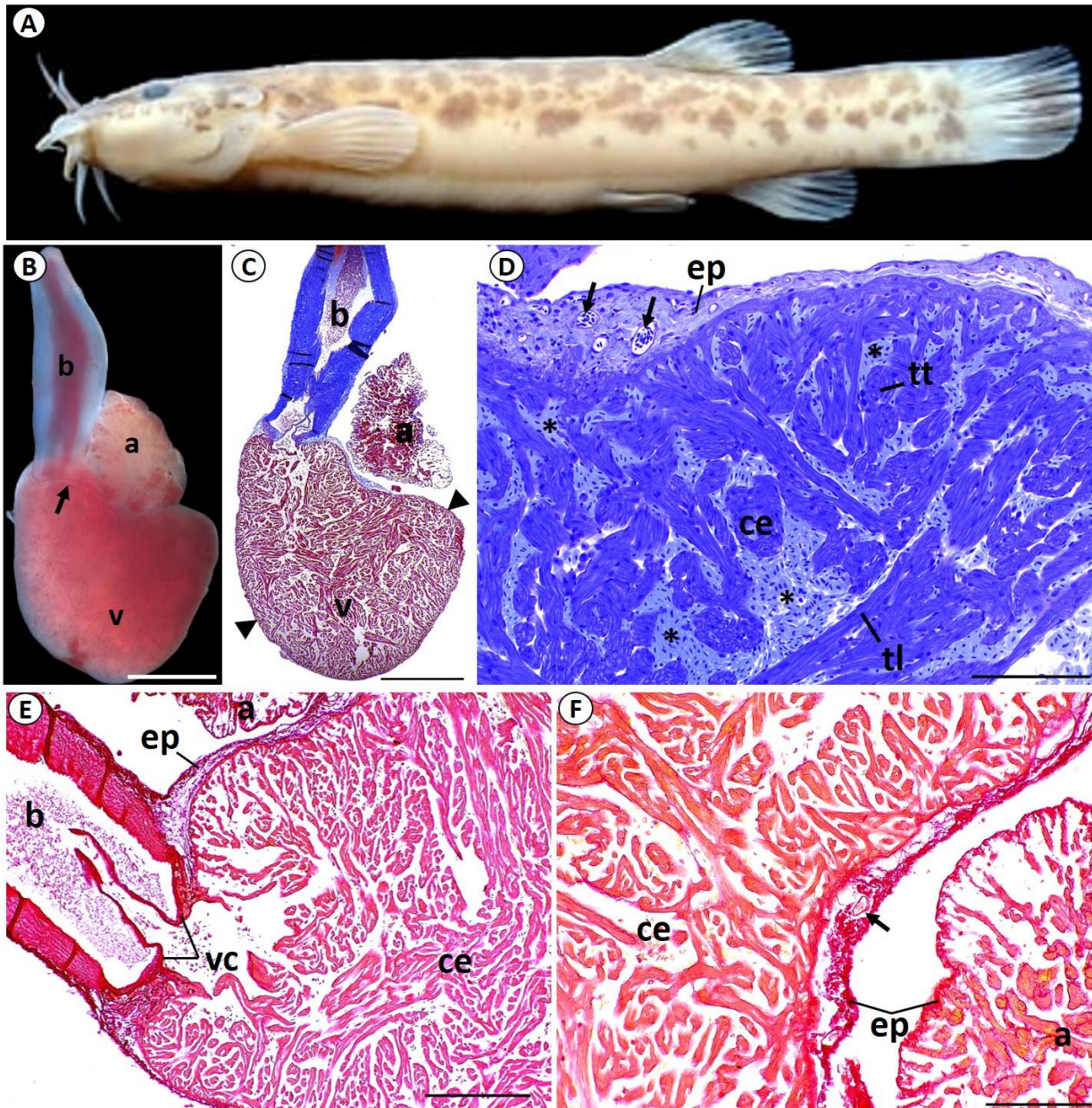
**Fig. 23: Anatomia e histologia do ventrículo de *Cetopsorhamdia iheringi*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular. Note a presença de artérias coronárias na superfície do ventrículo e do bulbo (setas). C: Secção histológica do coração evidenciando a camada compacta externa (cabeças de seta). D: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando as camadas compacta e esponjosa (cabeças de seta). E: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de vasos coronários na compacta. A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. F: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes musculares em orientação longitudinal e circular. Note a presença de vasos coronários (setas). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. **Coloração:** C, D: picosirius; E, F: azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 200  $\mu$ m; D, E: 50  $\mu$ m.



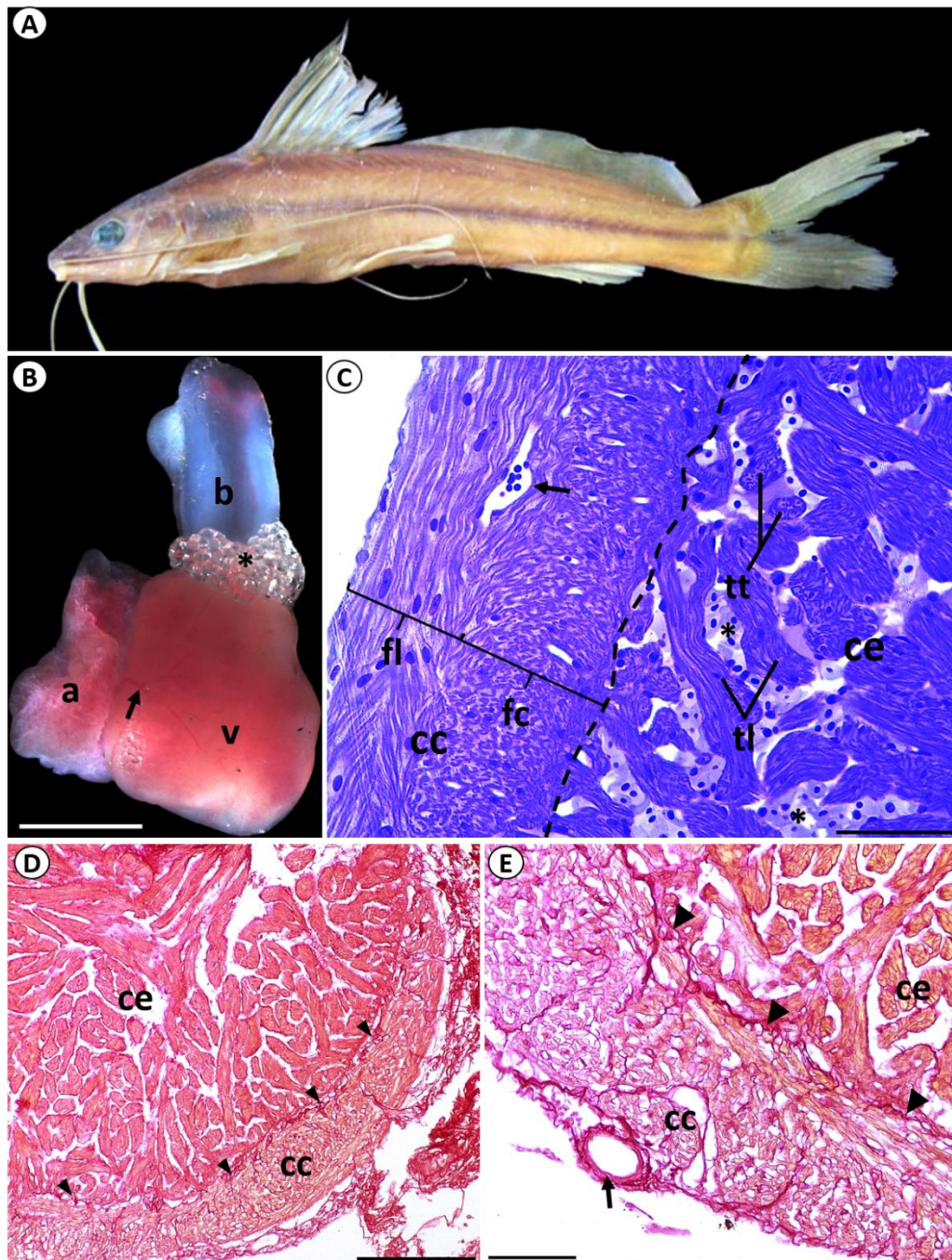
**Fig. 24: Anatomia e histologia do ventrículo de *Imparfinis mirini*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista lateral direita (B) e esquerda (C) evidenciando o ventrículo sacular. Note a presença de vasos coronários superficiais (setas) e de pigmentação restrita ao seio venoso (cabeças de seta), D: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares na camada compacta e a presença de vasos coronários (seta). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas preenchidas por sangue entre as trabéculas (asteriscos). A linha pontilhada demonstra o limite entre as camadas. **Coloração:** D: azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; s: seio venoso; v: ventrículo **Barras de escala:** B, C: 0,1cm; D: 200  $\mu$ m.



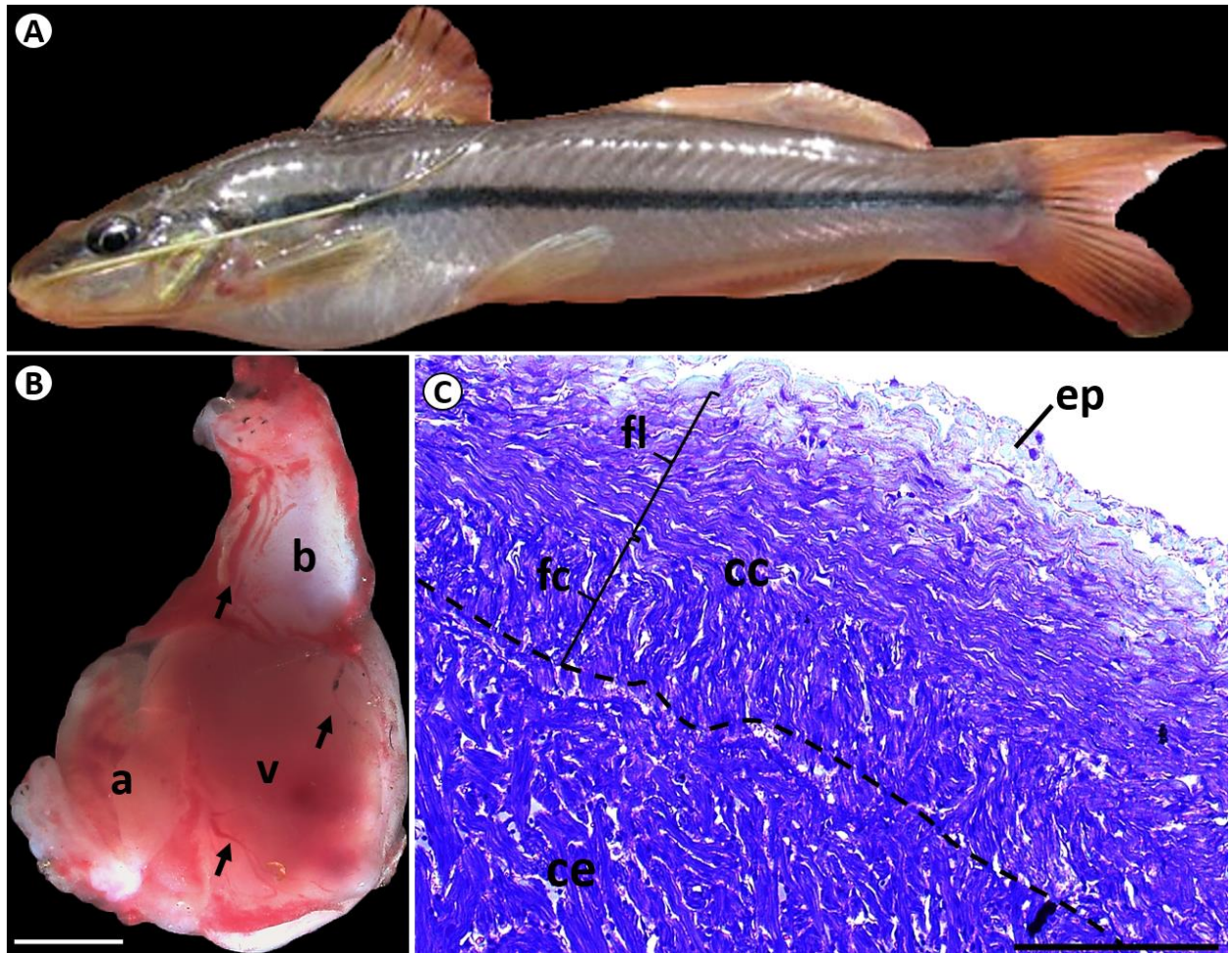
**Fig. 25: Anatomia e histologia do ventrículo de *Corydoras aeneus*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral direita evidenciando o ventrículo sacular. C: Secção histológica do coração evidenciando o miocárdio inteiramente trabeculado composto apenas pela camada esponjosa. As cabeças de seta apontam para a ausência de compactação externa. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). D: A camada esponjosa é formada por trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos). As cabeças de seta apontam para a conexão direta entre as trabéculas e o epicárdio, devido à ausência de camada compacta. **Coloração:** C: Picrosirius; D: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo **Barras de escala:** B: 0,1cm; C, D: 200 µm.



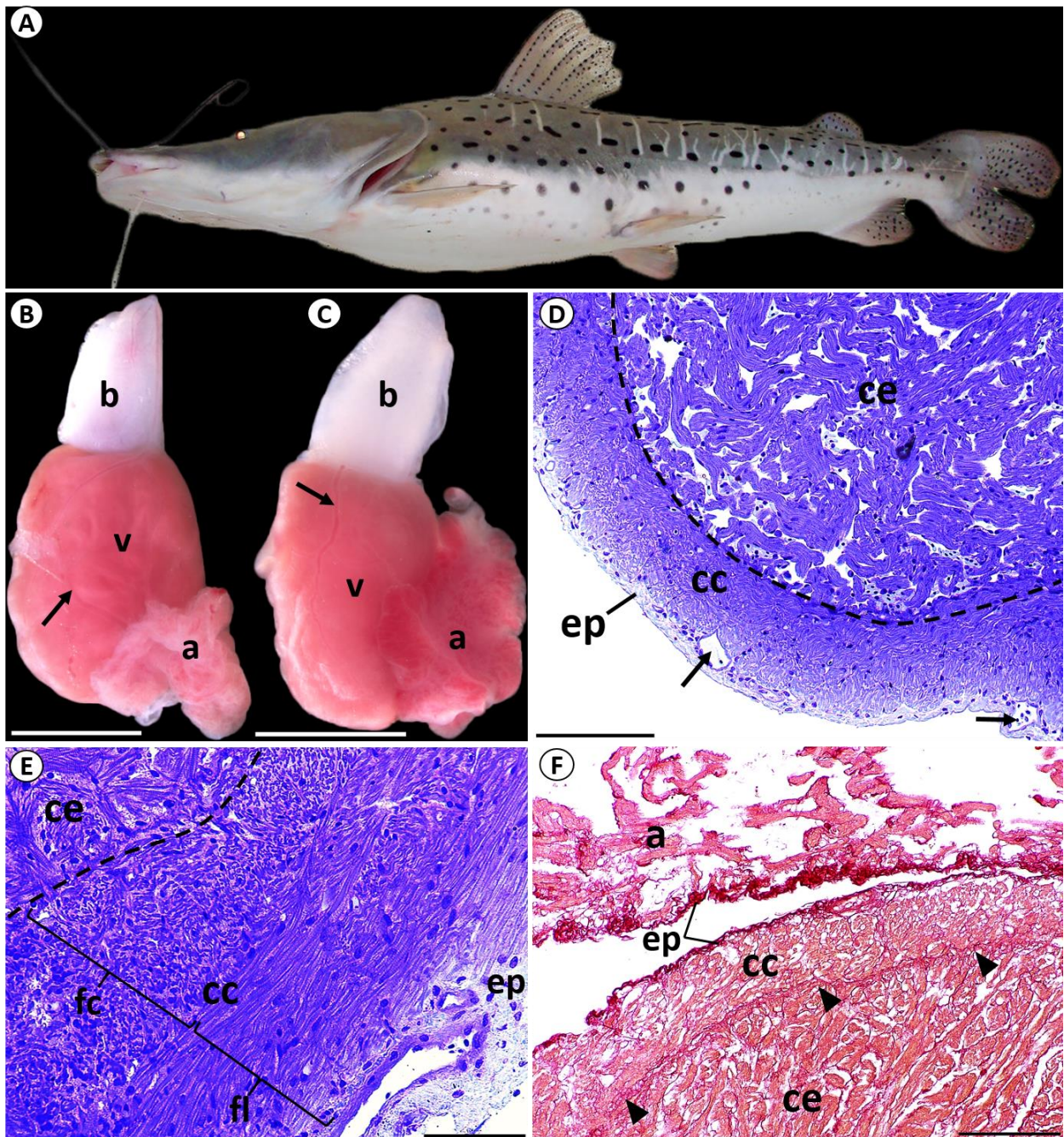
**Fig. 26: Anatomia e histologia do ventrículo de *Cambeva diabolus*.** A: Foto do espécime em vista lateral, utilizada a partir de Hoffmann et al. (2015). B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo de formato atípico. Note a aposição do átrio e do bulbo e ausência de bordas definidas no ventrículo. C: Secção histológica do coração evidenciando o miocárdio inteiramente trabeculado composto apenas pela camada esponjosa. As cabeças de seta apontam para a ausência de compactação externa. D: Secção histológica semifina evidenciando a camada esponjosa formada por trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas preenchidas por sangue entre as trabéculas (asteriscos) e artérias coronárias restritas ao epicárdio (setas). E: Secção histológica evidenciando as válvulas do cone entre o ventrículo e o bulbo arterioso. F: Secção histológica evidenciando o miocárdio trabeculado presente no ventrículo e no átrio. Note a presença de vasos coronários no epicárdio do ventrículo (seta) e ausência no epicárdio do átrio. **Coloração:** C: Tricrômico de Masson; D: Azul de toluidina; E, F: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo; vc: valva do cone **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 500 µm; D: 50 µm; E: 200 µm; F: 100 µm.



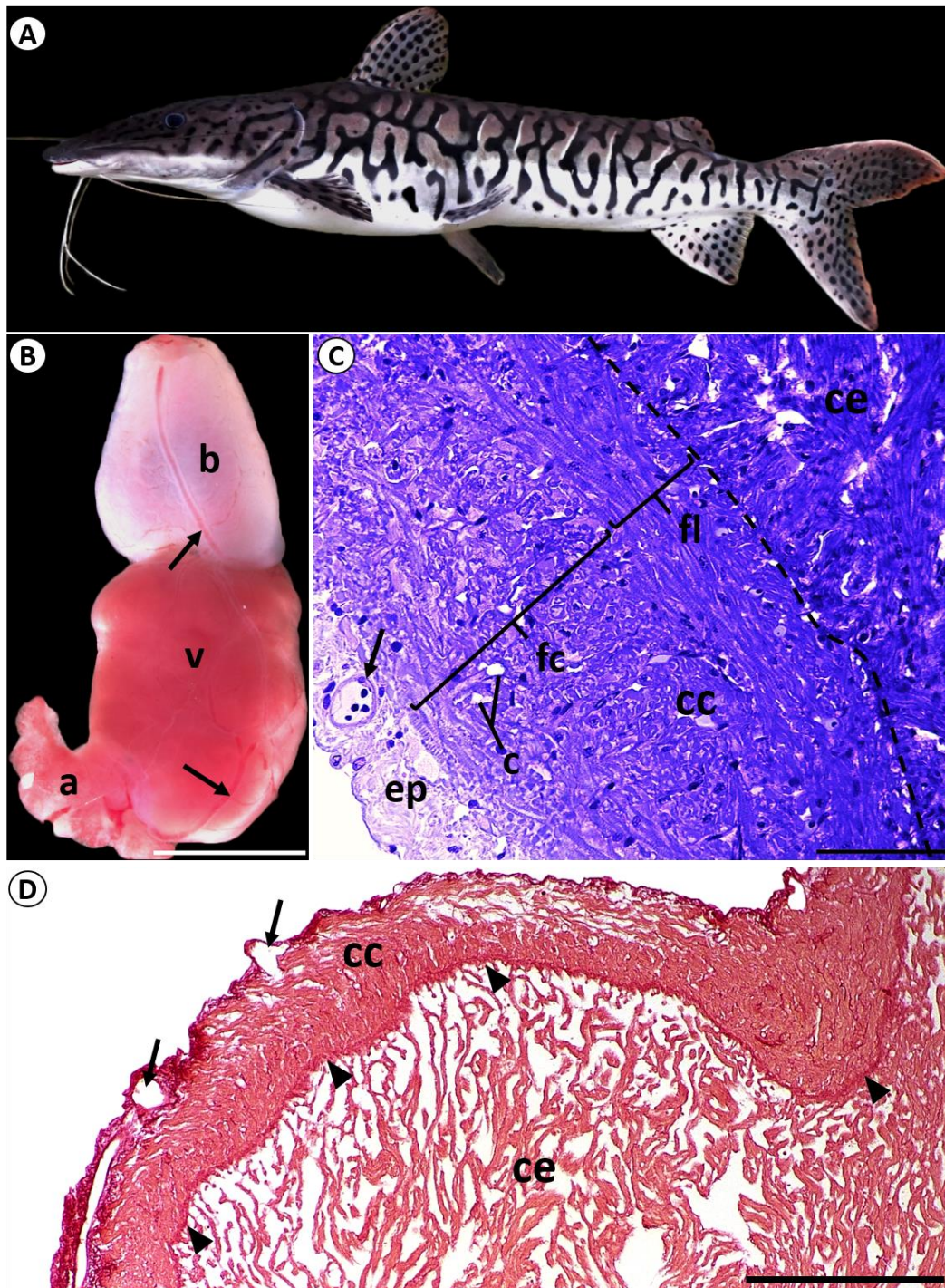
**Fig. 27: Anatomia e histologia do ventrículo de *Pimelodella avanhandavae*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular. Note o acúmulo de gordura entre o bulbo e o ventrículo (asterisco) e as artérias coronárias superficiais (seta). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes em orientação longitudinal e circular na compacta e a presença de vasos coronários (seta). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas entre as trabéculas preenchidas por sangue (asteriscos). D e E: Secção histológica do ventrículo em maior (E) e menor (D) aumento evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas. Note o vaso coronário epicárdico (seta). **Colorações:** C: azul de toluidina; D e E: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 50 µm; D: 100µm; E: 50µm.



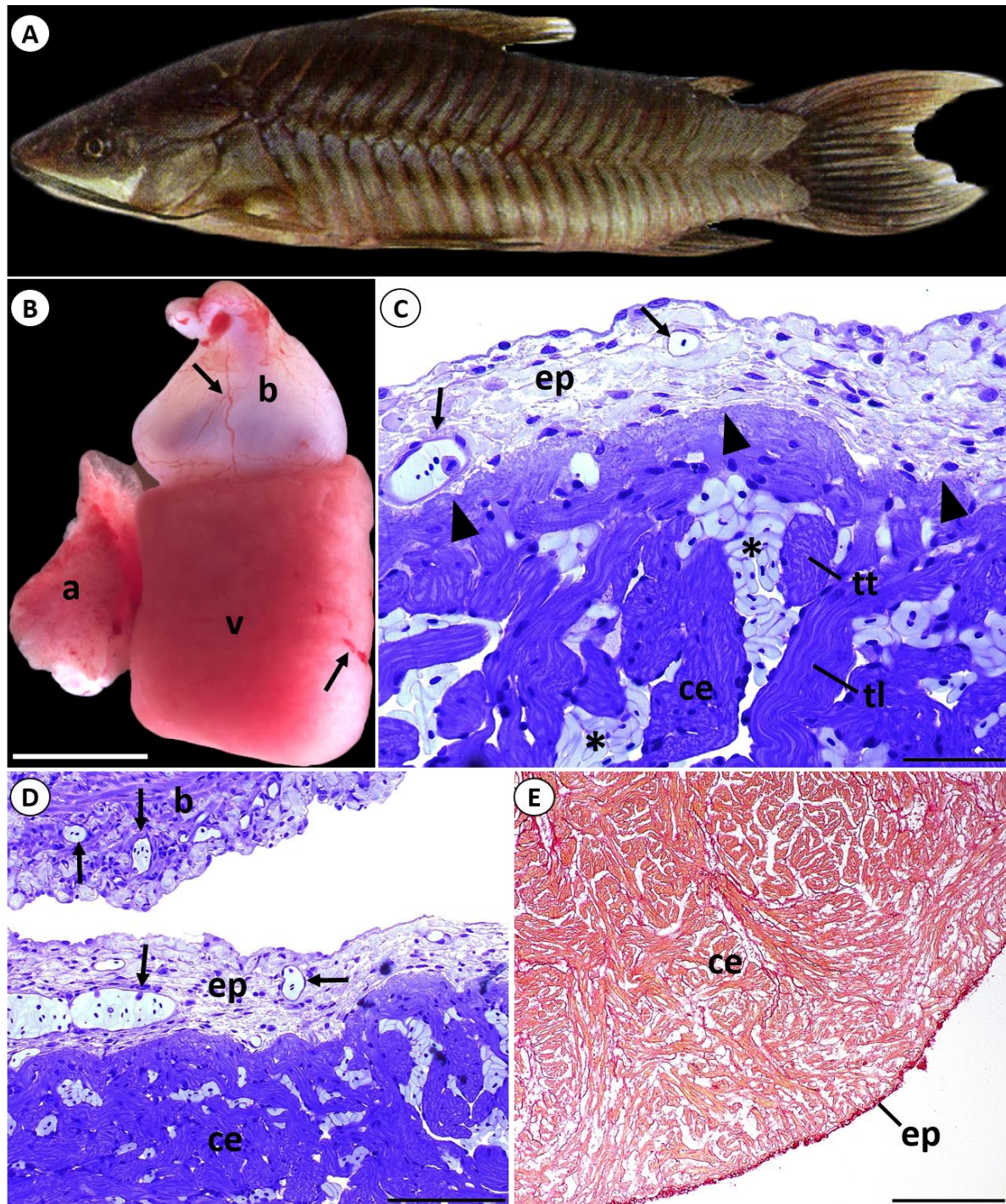
**Fig. 28: Anatomia e histologia do ventrículo de *Rhamdia quelen*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular e artérias coronárias superficiais (setas). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes longitudinais e circulares na compacta. **Colorações:** C: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 100µm.



**Fig. 29: Anatomia e histologia do ventrículo de *Pseudoplatystoma corruscans*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração em vista ventral (B) e lateral esquerda (C) evidenciando o ventrículo sacular e artérias coronárias superficiais (setas pretas). D: Secção histológica semifina em maior aumento do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de vasos coronários miocárdicos (setas). E: Secção histológica do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes longitudinais e circulares. F: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas (cabeças de seta). Note a ausência de compactação no miocárdio atrial. **Colorações:** D e E: Azul de toluidina; F: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B e C: 0,2cm; D: 200 µm; E: 50µm; F: 100 µm.



**Fig. 30: Anatomia e histologia do ventrículo de *Pseudoplatystoma fasciatum*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular e artérias coronárias superficiais (setas pretas). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes longitudinais e circulares. Note a presença de vaso coronário epicárdico (seta) e pequenos capilares miocárdicos. D: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas (cabeças de seta). Note a presença de vasos coronários epicárdicos (setas). **Colorações:** C: Azul de toluidina; D: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; c: capilares; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,2cm; C: 50µm; D: 200µm.

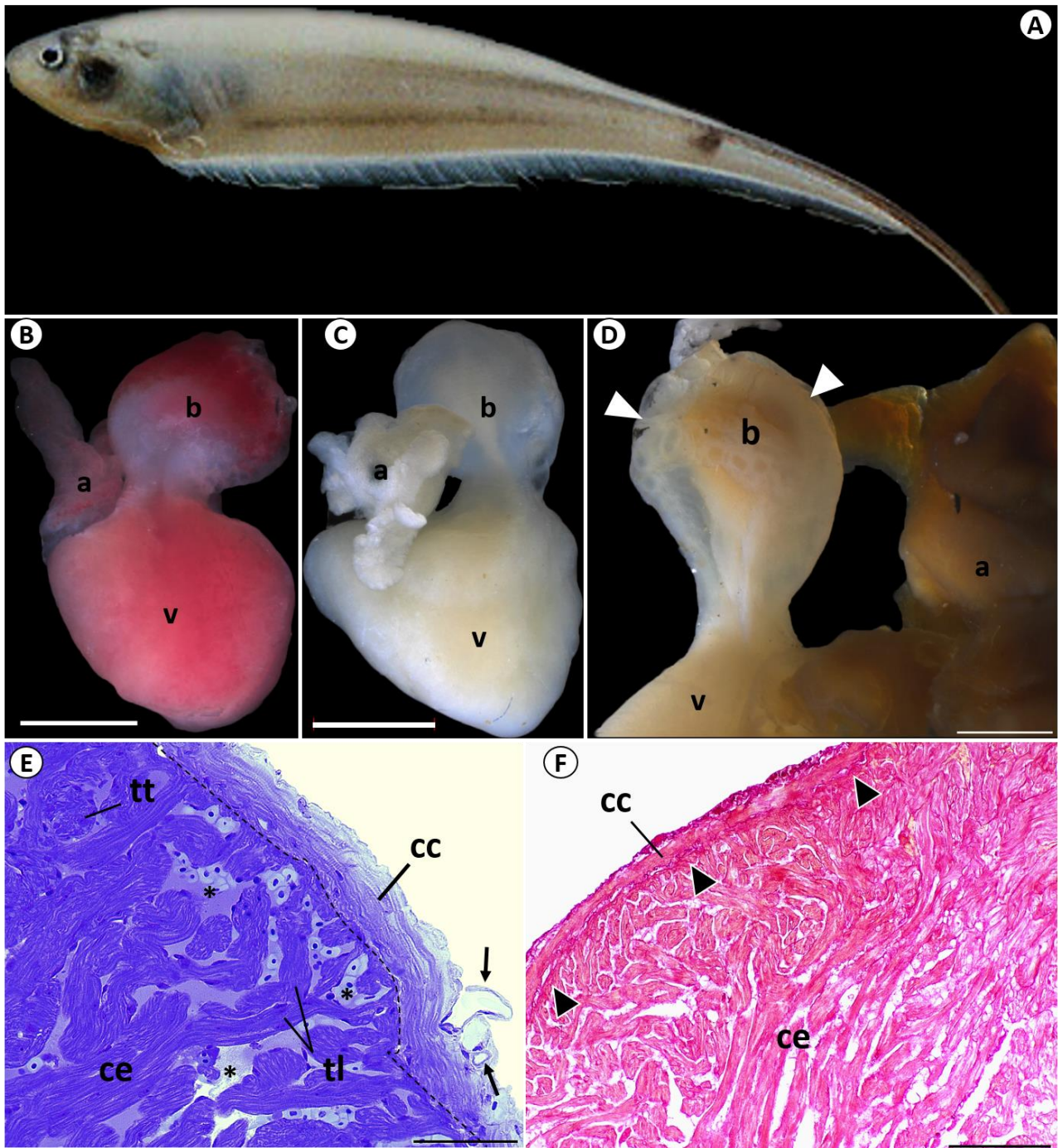


**Fig. 31: Anatomia e histologia do ventrículo de *Hoplosternum littorale*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo sacular. C e D: Secção histológica do ventrículo em menor (D) e maior (C) aumento evidenciando o miocárdio inteiramente trabeculado composto apenas pela camada esponjosa. As trabéculas apresentam orientação longitudinal e transversal. As cabeças de seta apontam para a ausência de compactação externa. Note a presença de lacunas entre as trabéculas (asteriscos) e vasos coronários epicárdicos no ventrículo e no bulbo arterioso. E: Secção histológica do ventrículo em maior aumento apontando colágeno (cor vermelha) na região do epicárdico. Devido à ausência de camada compacta, o arco de colágeno que separa as camadas é ausente. **Coloração:** C e D: Azul de Toluidina; E: Picrossirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo **Barras de escala:** B: 0,1cm; C, D: 200  $\mu$ m.

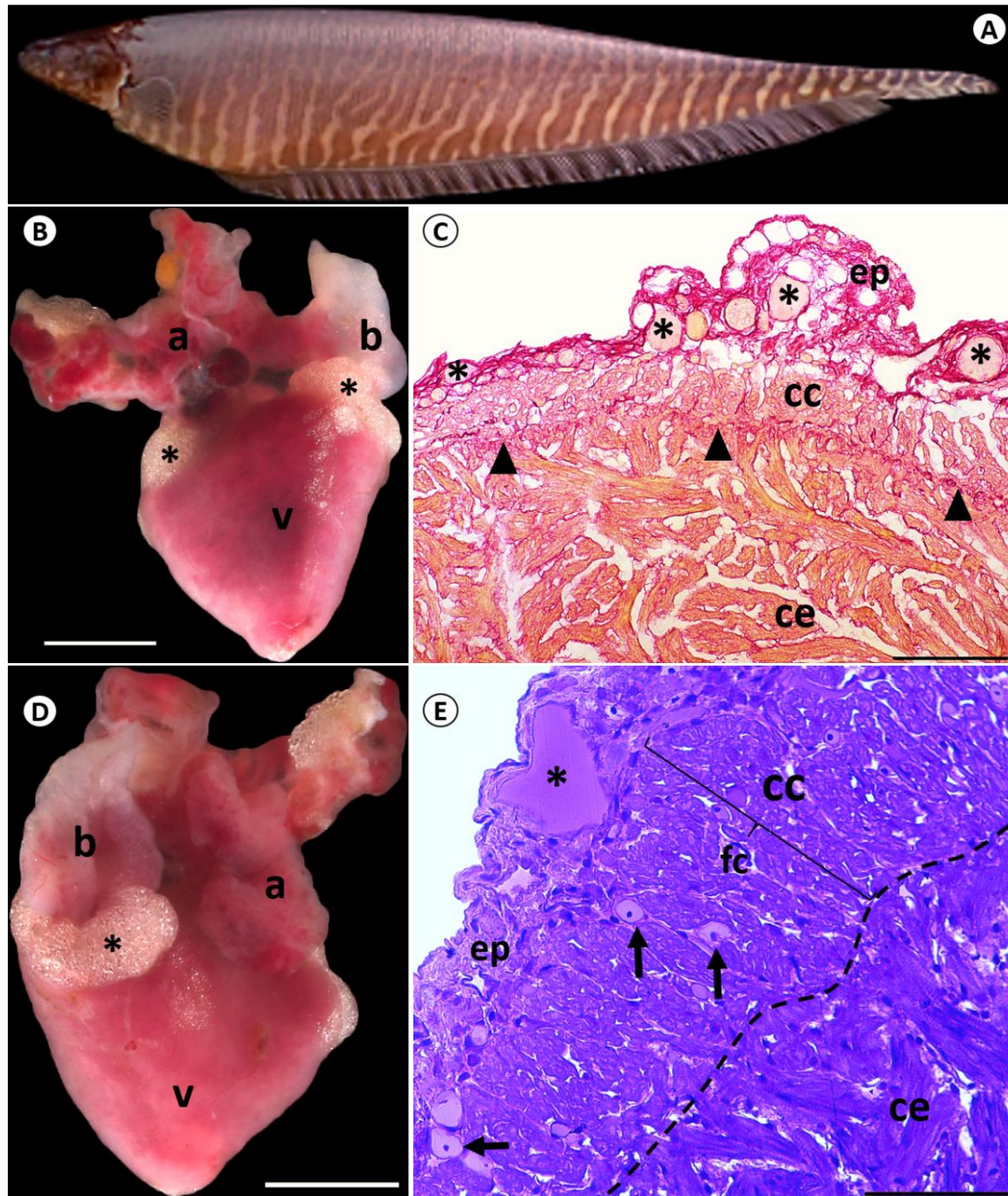
Em relação à ordem dos Gymnotiformes, *Eigenmannia virescens* (Valenciennes, 1836) e *Gymnotus cuia* apresentaram um ventrículo piramidal (Figs. 32B, C; 33B, D). Entretanto, o ventrículo de *E. virescens* apresentou ápices mais arredondados do que observado em Characoidei (Figs. 32B, C). Em ambas as espécies, a mioarquitetura ventricular foi do tipo mista, com camada compacta formada por feixes musculares apenas em orientação longitudinal (compacta simples) (Figs. 32E; 33E;). O arco de colágeno que delimita as camadas compacta e esponjosa também foi observado (Figs. 32F; 33C). As análises de MEV revelaram um padrão de conexão entre as camadas do miocárdio, com um maior número de bifurcações ocorrendo nas trabéculas periféricas da camada esponjosa antes da conexão com os feixes musculares da camada compacta (Fig. 37E, F). Capilares foram observados apenas no miocárdio compacto, possibilitando a classificação dos ventrículos como tipo II. As trabéculas da camada esponjosa também apresentaram orientação longitudinal e transversal, com espaços intertrabeculares evidentes (Figs. 32E). O bulbo arterioso de *E. virescens* apresentou formato piriforme invertido, atípico em relação aos formatos descritos por Icardo (2012) (Fig. 32D). O formato piriforme invertido difere quanto à posição da porção dilatada e afilada do bulbo quando comparado ao formato piriforme padrão. Apenas em *E. virescens*, a porção dilatada do bulbo mostrou-se distal e a afilada proximal em relação ao ventrículo. Assim, este estudo apresentou o primeiro relato deste formato anatômico no bulbo arterioso de um teleósteo, cujo significado funcional ainda é desconhecido. Dados do coração de Gymnotiformes na literatura estão disponíveis apenas para *Electrophorus electricus* (Linnaeus, 1766) (Camilli et al., 1989), os quais apresentam semelhanças na morfologia ventricular com o observado em *E. virescens* e *G. cuia*.

Por fim, foi avaliada a morfologia do ventrículo em espécies da ordem Cypriniformes: *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, e *Gyrinocheilus aymonieri* (Tirant, 1883). Nestas espécies, observamos o mesmo modelo de ventrículo piramidal tipo II descrito para Characoidei: anatomia com formato piramidal associado a um miocárdio misto e vasos coronários restritos a uma camada compacta com arquitetura composta (Figs. 34B-E; 35B-E; 36B, C). As principais diferenças ocorreram quanto à angulação dos ápices e distribuição superficial das artérias coronárias (Figs. 34B; 35B, D; 36B;). O arco de colágeno presente entre as

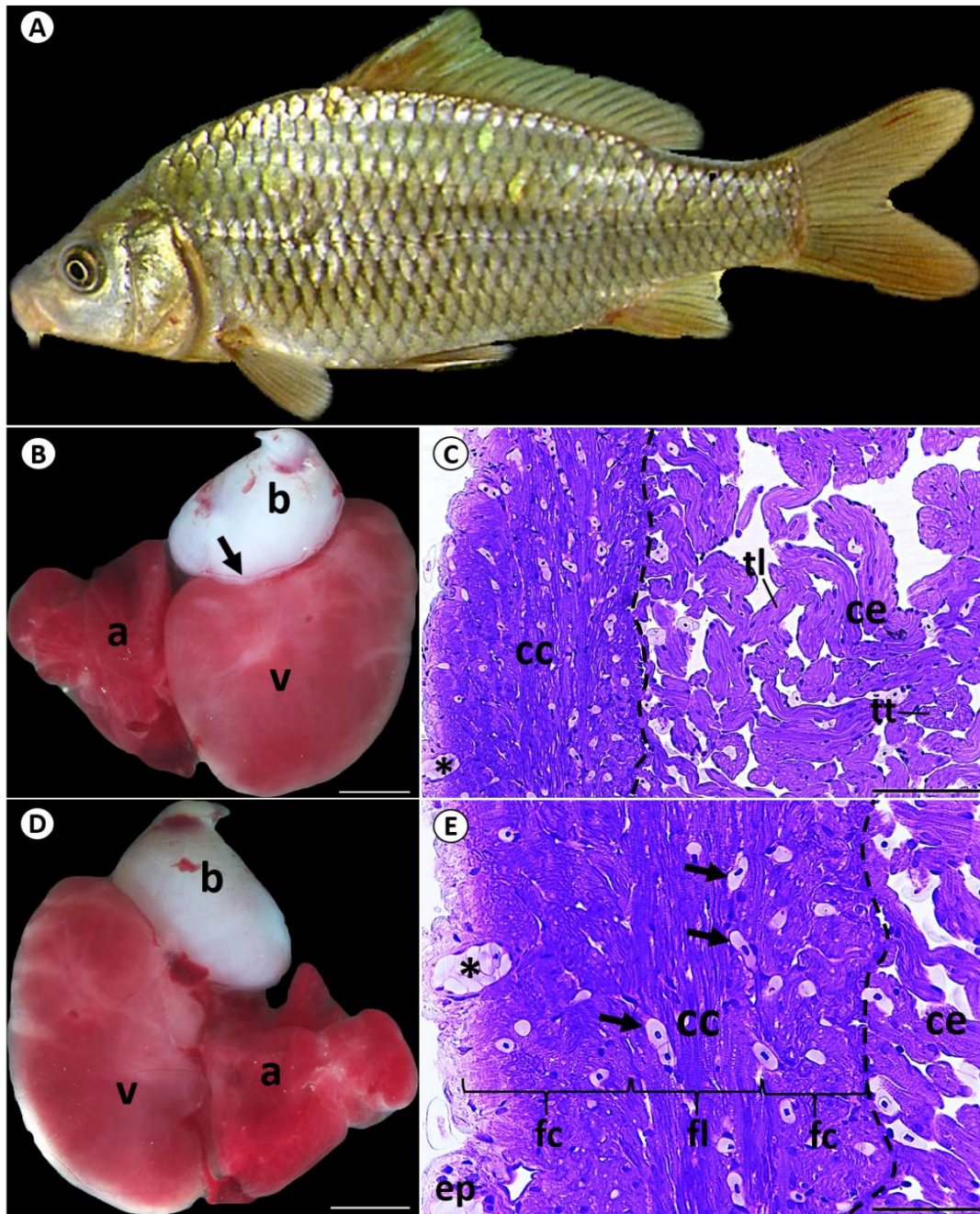
camadas compacta e esponjosa também foi observado (Fig. 36D). Um resumo dos caracteres morfológicos levantados para o ventrículo das espécies estudadas está presente na tabela 1.



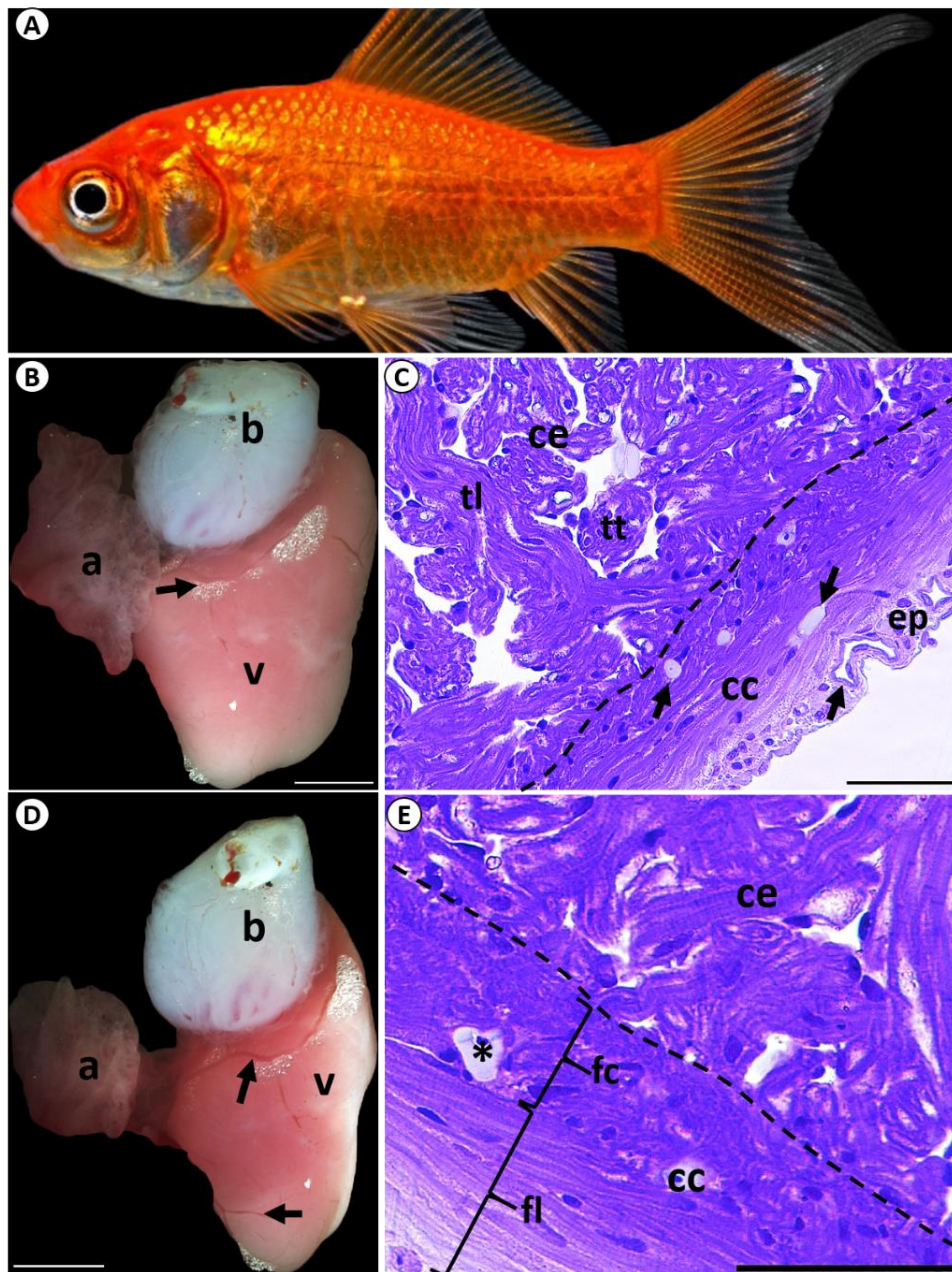
**Fig. 32: Anatomia e histologia do ventrículo de *Eigenmannia virescens*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B e C: Anatomia do coração natural (B) e fixado (C) em vista ventral e lateral esquerda, respectivamente, evidenciando o ventrículo de formato piramidal. D: Anatomia do coração fixado evidenciando o bulbo arterioso com formato piriforme invertido (cabeças de seta brancas). E: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de feixes apenas em orientação longitudinal na camada compacta e a presença de vasos coronários (setas). A camada esponjosa é formada por trabéculas em orientação longitudinal e transversal. Note a presença de lacunas preenchidas por sangue entre as trabéculas (asteriscos) F: Secção histológica evidenciando arco de colágeno (cabeças de seta) presente entre as camadas compacta e esponjosa. **Colorações:** E: Azul de toluidina; F: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo **Barras de escala:** B, C: 0,1cm; D: 0,05 cm; E, F: 50  $\mu$ m.



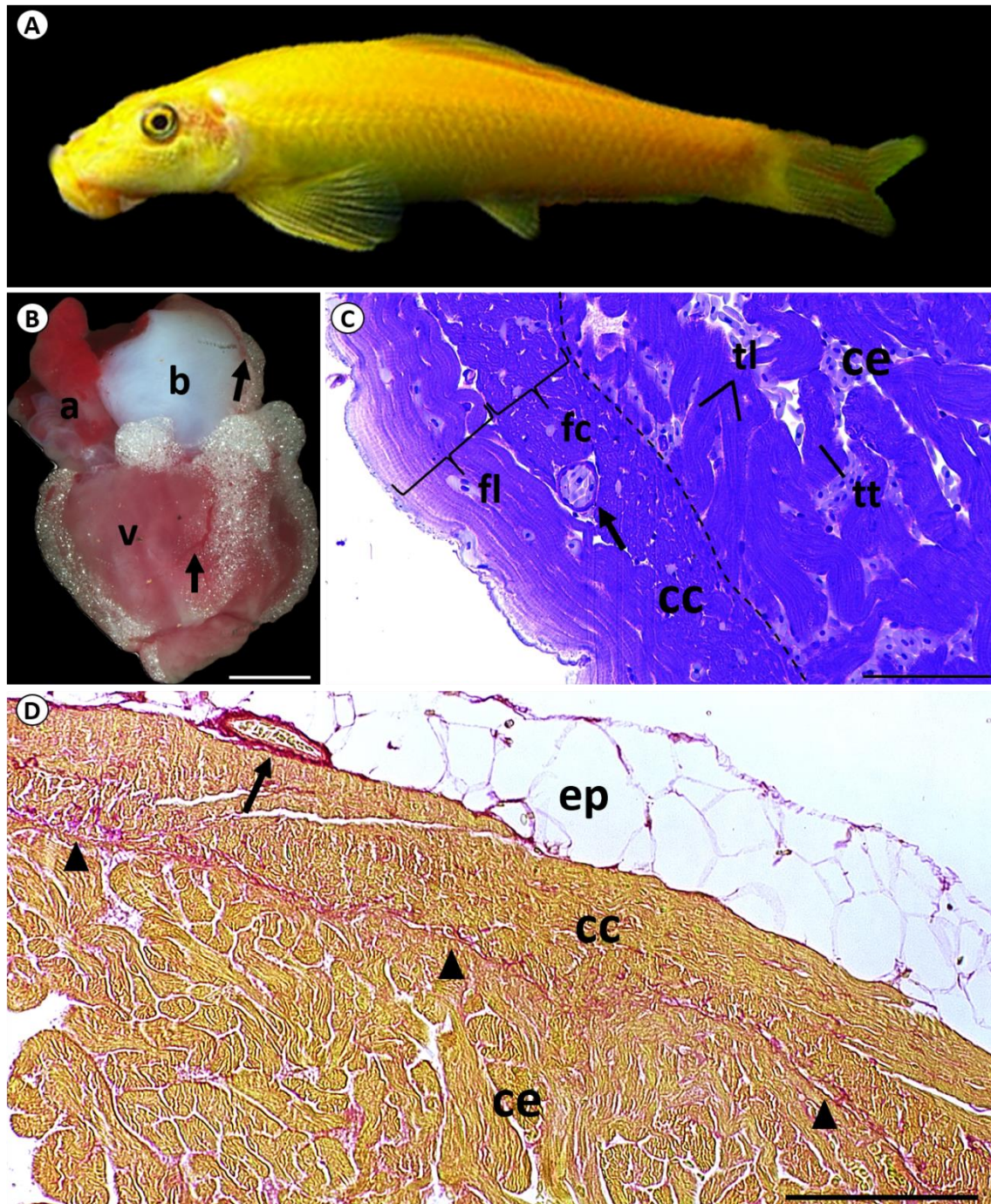
**Fig 33: Anatomia e histologia do ventrículo de *Gymnotus cuia*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a deposição de lipídio entre o bulbo e o átrio e entre o átrio e o ventrículo (asterisco). C: Secção histológica do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Ambas as camadas são separadas por um arco de colágeno (cabeça de setas). Note a presença de artérias coronárias epicárdicas (asterisco). D: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a deposição de lipídio entre o bulbo e o átrio e entre o átrio e o ventrículo (asterisco). E: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta prioritariamente por feixes musculares circulares. Note a presença de capilares na compacta (setas) e vasos coronários subepicárdicos (asterisco). **Coloração:** C: Picrosirius; E: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,2cm; C: 100µm; D: 0,2cm; E: 50µm



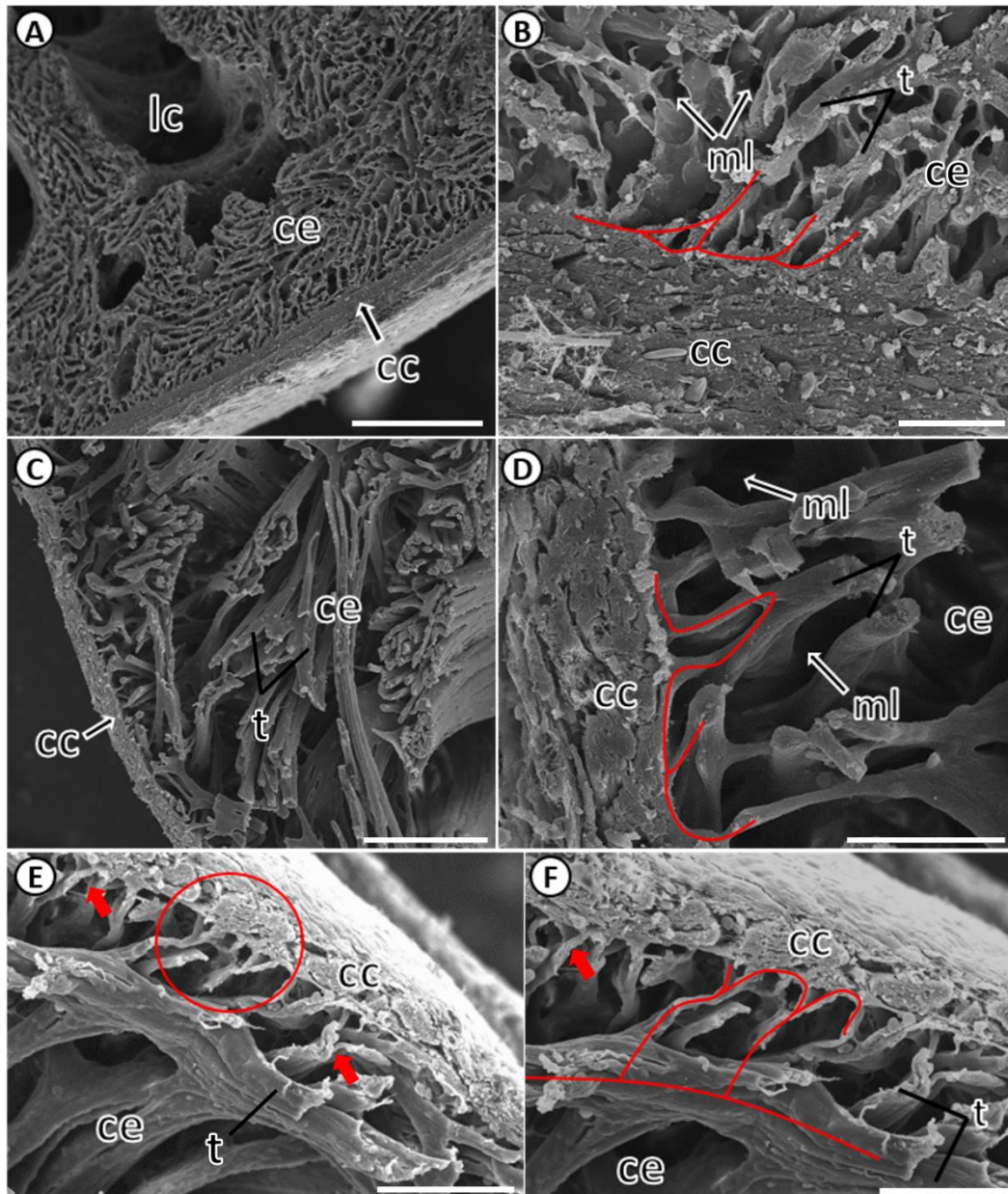
**Fig. 34: Anatomia e histologia do ventrículo de *Cyprinus carpio*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a presença de artérias coronárias na superfície do bulbo (seta). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de artéria coronária entre o epicárdio e o miocárdio (asterisco). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. D: Anatomia do coração em vista lateral direita evidenciando o ventrículo piramidal E: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta externa composta por feixes longitudinais e circulares e a presença de vasos coronários (setas). Note o feixe longitudinal posicionado entre dois feixes circulares e a presença de artéria coronária entre o epicárdio e o miocárdio (asterisco). **Coloração:** C, E: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 200 µm; D: 0,1cm; E: 50µm.



**Fig. 35: Anatomia e histologia do ventrículo de *Carassius auratus*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a presença de artérias coronárias na superfície ventrículo (seta). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando o miocárdio misto composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note a presença de artérias coronárias epicárdicas e miocárdicas (setas). A camada esponjosa apresenta trabéculas em orientação longitudinal e transversal. D: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal. Note a presença de artérias coronárias na superfície ventrículo (seta). E: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta externa composta por feixes longitudinais e circulares e a presença de vasos coronários (asterisco). **Coloração:** C, E: Azul de toluidina. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,1cm; C: 200 µm; D: 0,1cm; E: 50µm.



**Fig. 36: Anatomia e histologia do ventrículo de *Gyrinocheilus aymonieri*.** A: Foto do espécime em vista lateral. B: Anatomia do coração em vista lateral esquerda evidenciando o ventrículo piramidal e artérias coronárias superficiais (setas pretas). C: Secção histológica semifina do ventrículo evidenciando a camada compacta composta por feixes longitudinais e circulares. Note a presença de vasos coronários na camada compacta (seta). D: Secção histológica do ventrículo evidenciando o arco de colágeno (cabeças de seta) separando ambas as camadas compacta e esponjosa. Note a presença de vaso coronário epicárdico (seta). **Colorações:** C: Azul de toluidina; D: Picrosirius. **Abreviações:** a: átrio; b: bulbo arterioso; cc: camada compacta; ce: camada esponjosa; ep: epicárdio; fc: feixes circulares; fl: feixes longitudinais; tl: trabéculas longitudinais; tt: trabéculas transversais; v: ventrículo. **Barras de escala:** B: 0,2cm; C: 50µm; D: 50µm.



**Fig. 37: Microscopia eletrônica de varredura dos ventrículos de *Hoplias malabaricus*, *Apareiodon affinis* e *Gymnotus cuia*. A e B: *Hoplias malabaricus*. O miocárdio ventricular é composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. Note em B a curvatura das trabéculas periféricas para criar uma superfície de contato paralela com a camada compacta (linhas vermelhas). C e D: *Apareiodon affinis*. O miocárdio ventricular é composto por uma camada compacta delgada externa e esponjosa interna. Note em D a curvatura das trabéculas periféricas para criar uma superfície de contato paralela com a camada compacta (linhas vermelhas). E e F: *Gymnotus cuia*. O miocárdio ventricular é composto por uma camada compacta externa e esponjosa interna. As setas e círculo vermelho destacam as bifurcações das trabéculas terminais e posterior curvatura para criar uma superfície de contato paralela com a camada compacta (linhas vermelhas). Abreviações: cc: camada compacta, ce: camada esponjosa, lc: lacunas, ml: micro lacunas, t: trabéculas. Barras de Escala: A: 100 µm; B: 20 µm; C: 100 µm; D: 20 µm; E e F: 40 µm.**

| Ordem         | Família          | Taxons                                                         | Ventrículo  | Miocárdio                 | Vascularização           | Referência                          |
|---------------|------------------|----------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Characiformes | Alestidae        | <i>Phenacogrammus interruptus</i> (Boulenger, 1899)            | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Roeboides descahadenensis</i> (Pignatelli, 1975)            | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Characidae       | <i>Astyanax laietanus</i> (Lütken, 1875)                       | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Astyanax mexicanus</i> (De Filippi, 1853)                   | Piramidal   | Misto (?)                 | Restrita a compacta      | Tang et al., (2018)                 |
|               |                  | <i>Platystichus argenteus</i> Reinhardt, 1867                  | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Leporinus macrocephalus</i> Garavito & Britski, 1988        | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Anastomidae      | <i>Leporinus obtusidens</i> Garavito & Britski, 1988           | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Leporinus elongatus</i> (Valenciennes, 1837)                | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Gardinal et al., (2018)             |
|               | Prochilodontidae | <i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)               | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Crenuchidae      | <i>Characidium gomesi</i> Travassos, 1956                      | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Parodontidae     | <i>Apistogramma affinis</i> (Steindachner, 1879)               | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Bryconidae       | <i>Brycon orbignyanus</i> (Valenciennes, 1850)                 | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Brycon amazonicus</i> (Spix & Agassiz, 1829)                | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Observações não publicadas          |
|               | Curimatidae      | <i>Cyphocharax modestus</i> (Fernández-Yépez, 1948)            | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Erythrinidae     | <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)                       | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo Gardinal et al., (2018) |
|               | Serrasalminidae  | <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)                | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Simões et al., (2002)               |
|               |                  | <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1816)                     | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Simões et al., (2002)               |
|               | Hemiodontidae    | <i>Hemiodus gracilis</i> Günther, 1864                         | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Imparfinis mirini</i> (Quoy & Gaimard, 1824)                | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Heptapteridae    | <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)                   | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
| Siluriformes  |                  | <i>Pimelodella vanhandavae</i> Eigenmann, 1917                 | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Cetopomoxystus iheringi</i> Schubart & Gomes, 1959          | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Loricariidae     | <i>Hypostomus ancistroides</i> (Thering, 1911)                 | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Trichomycteridae | <i>Cambeva diabolica</i> Bockmann, Casatti & de Pinna, 2004    | "Piramidal" | Trabeculado               | Restrita ao subepicárdio | Este estudo                         |
|               |                  | <i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock, 1828)                  | Sacular     | Trabeculado               | Restrita ao subepicárdio | Este estudo                         |
|               | Callichthyidae   | <i>Corydoras aeneus</i> (Gill, 1858)                           | Sacular     | Trabeculado               | Restrita ao subepicárdio | Este estudo                         |
|               | Doradidae        | <i>Pterodoras granulosus</i> (Valenciennes, 1821)              | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Gardinal et al., 2018               |
|               |                  | <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix & Agassiz, 1829)      | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Pimelodidae      | <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (Linnaeus, 1766)             | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Clariidae        | <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)                     | Sacular     | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Simões et al., (2002)               |
| Gymnotiformes | Sternopygidae    | <i>Eigenmannia virescens</i> (Valenciennes, 1836)              | Piramidal   | Misto (compacta simples)  | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Gymnotidae       | <i>Electrophorus electricus</i> (Linnaeus, 1766)               | Piramidal   | Misto (?)                 | Restrita a compacta      | Camilli et al., (1989)              |
| Cypriniformes |                  | <i>Gymnotus cuia</i> Craig, Malabarba, Crampton & Albert, 2018 | Piramidal   | Misto (compacta simples)  | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Cyprinidae       | <i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)                      | Piramidal   | Misto (compacta composta) | ?                        | Este estudo                         |
|               | Cyprinidae       | <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758                          | Piramidal   | Misto (compacta composta) | Restrita a compacta      | Este estudo                         |
|               | Danionidae       | <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)                            | Piramidal   | Misto (compacta composta) | ?                        | Hu et al. (2001)                    |

**Tab.1: Resumo dos caracteres morfológicos presentes no ventrículo de 28 espécies descritas neste estudo e 9 espécies descritas na literatura pertencentes a subordem: Characoidei e ordens: Siluriformes Gymnotiformes e Cypriniformes.** Os termos “compacta simples” e “compacta composta” se referem a composição da camada compacta por feixes musculares em apenas uma orientação ou múltiplas orientações, respectivamente.

## 4.2. Inferências funcionais

Em relação à anatomia externa, o estudo de Rowlatt (1968) descreveu em mamíferos a correlação existente entre a anatomia ventricular e seu desempenho. Foi estabelecida uma hipótese de que ventrículos mais pontudos seriam característicos de espécies com maior mobilidade (LECHNER, 1942). Segundo Rowlatt (1968), essa relação poderia ser explicada pela lei de Laplace, a qual associa a pressão no interior do lúmen, a tensão intramural e o raio de curvatura de uma câmara. De acordo com esta lei, é provável que ventrículos longos e estreitos, com baixo volume diastólico, necessitem de menor tensão do miocárdio para desenvolver pressão sistólica em comparação a ventrículos arredondados, recebendo assim uma vantagem significativa no desenvolvimento de pressão e sustentação do trabalho cardíaco. Apesar dessas inferências terem sido realizadas em corações de mamíferos (ROWLATT, 1968), a relação entre formato externo do ventrículo e seu desempenho também ocorre em peixes (FARRELL; JONES, 1992).

Em peixes, os diferentes formatos anatômicos do ventrículo possuem implicações funcionais. O formato piramidal é o que mais se assemelha ao formato do ventrículo de mamíferos, sendo frequentemente associado a uma camada compacta espessa bem desenvolvida e observado em espécies migratórias de hábito natatório intenso (PIEPERHOFF et al. 2009). Segundo a lei de Laplace, devido a este formato apresentar menores raios de curvatura, teria maior capacidade de desenvolver pressão sistólica e sustentar trabalho cardíaco. Essa associação foi demonstrada em um estudo realizado com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), no qual foi colocada à prova a capacidade natatória de diversos exemplares e foi observado que um menor desempenho natatório esteve associado a exemplares com ventrículos mais arredondados. Ainda, os autores inferem que conhecer o formato ventricular, associado aos fatores fisiológicos e biológicos da espécie, tem potencial para prever o desempenho natatório (CLAIREAUX et al., 2005).

O formato sacular é geralmente associado a espécies de locomoção restrita e a um miocárdio inteiramente trabeculado, sendo descrito em diversas espécies marinhas de hábito bentônico (GREER WALKER et al., 1985). O formato tubular possui implicações semelhantes ao sacular, porém é observado frequentemente em espécies de corpo alongado (SANTER, 1985). Entretanto, a relação entre anatomia, mioarquitetura e hábito natatório nem sempre é constante (SIMÕES et al., 2002; ICARDO et al., 2005; ICARDO, 2012, 2017; GARDINAL et al., 2018; GARDINAL et al., 2019). Até o momento, ventrículos piramidais e inteiramente trabeculados já foram descritos em espécies de hábito ativo (ICARDO et al., 2005), ventrículo piramidal possuindo uma camada compacta de arquitetura composta já foi observado em uma espécie sedentária (GARDINAL et al., 2018) e ventrículos saculares associados a um miocárdio misto foram descritos em diversos elasmobrânquios (SÁNCHEZ-QUINTANA et al., 1996; ICARDO, 2012, 2017). Assim, o hábito natatório de uma espécie nem sempre é um indicador preciso da morfologia ventricular.

No presente estudo, observamos o ventrículo piramidal associado a uma camada compacta composta bem desenvolvida em diferentes espécies de Characoidei, tanto na região Neotropical quanto na espécie africana

*Phenacogrammus interruptus*. Considerando as implicações funcionais do formato piramidal, a anatomia está de acordo com o hábito natatório ativo de Characoidei, uma vez que as espécies estão inseridas em ambientes pelágicos, frequentemente lóticos, e demonstram migração reprodutiva em sua maioria. As mesmas implicações funcionais podem ser atribuídas aos Cypriniformes estudados: *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* e *Gyrinocheilus aymonieri*.

Em Siluriformes, ocorreu maior variabilidade na morfologia ventricular. Nestas espécies, os ventrículos foram predominantemente saculares, achatados dorsoventralmente e associados a um miocárdio misto ou inteiramente trabeculado. A predominância da anatomia sacular foi observada tanto nas espécies neotropicais descritas neste estudo quanto na espécie africana *Clarias gariepinus* (SIMÕES et al., 2002). Dentre os teleósteos, é importante ressaltar que ventrículos saculares com mioarquitetura mista, demonstrando uma camada compacta composta, foram observados somente em Siluriformes até o momento (SIMÕES et al., 2002; GARDINAL et al., 2018). Assim como observado em muitos elasmobrânquios (SÁNCHEZ-QUINTANA et al., 1996), é possível inferir que em Siluriformes tenha se estabelecido uma associação entre o formato achatado do corpo com o formato arredondado e achatado do ventrículo, ou ainda, pode-se especular sobre os benefícios funcionais de um ventrículo arredondado em relação ao hábito de vida bentônico ou bentopelágico presente na maioria das espécies, ainda que esta característica esteja associada a um menor desempenho cardíaco segundo a lei de Laplace.

Em Gymnotiformes, os ventrículos de *Gymnotus cuia* e *Eigenmannia virescens* foram semelhantes ao observado em *Electrophorus electricus* (CAMILLI et al., 1989). O ventrículo destas espécies também se assemelha ao observado em Characoidei, porém apresentando uma camada compacta de estrutura simples, com somente feixes musculares em orientação longitudinal. A orientação longitudinal dos feixes musculares é considerada a arquitetura básica da camada compacta, que durante a sístole, reduz o diâmetro longitudinal e transversal do ventrículo. A adição de fibras orientadas circularmente, observada em Characoidei, Siluriformes e Cypriniformes, pode auxiliar o desenvolvimento de pressões mais altas (FARRELL e SMITH, 2017). Assim, é possível inferir que funcionalmente, os ventrículos dos Gymnotiformes estudados até o momento apresentariam menor

capacidade de gerar pressão arterial e de sustentar trabalho cardíaco comparado aos de Characoidei.

Nossos resultados trouxeram um questionamento em relação à composição da camada compacta e seu significado funcional. Segundo Farrell e Jones (1992), quanto maior a proporção da camada compacta, maior o número de feixes musculares em diferentes orientações. A organização da camada compacta envolvendo duas ou três diferentes orientações dos feixes musculares são evidentes em espécies ativas de grande porte, como peixes espada e atuns (SÁNCHEZ-QUINTANA e HURLE, 1987; ICARDO, 2017). Entretanto, observamos camadas compactas pouco evidentes formadas por feixes em orientação longitudinal e circular, como em *Hypostomus ancistroides*. Ainda, este padrão também foi encontrado em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (GARDINAL et al., 2018), caracterizada como espécie sedentária e não migratória (RANTIN et al., 1992). Assim, os resultados do presente estudo demonstraram que a complexidade estrutural da camada compacta ocorreu independentemente de sua espessura ou do hábito natatório das espécies.

### **4.3 Evolução dos caracteres morfológicos do ventrículo**

Atualmente, as principais hipóteses a respeito da evolução da compactação do miocárdio e da circulação coronária em peixes foram estabelecidas por Farrell et al. (2012) e revisadas em Duran et al. (2015) e Lorenzale et al. (2018). Segundo os autores, o miocárdio misto associado a vasos coronários tanto na camada compacta quanto nas trabéculas da camada esponjosa (tipos III ou IV), uma morfologia observada no ventrículo de todos os condrites vivos, poderia ser considerado também a condição presente em gnatostomados basais. Este seria o modelo de ventrículo basal em vertebrados, que teria precedido o ventrículo inteiramente trabeculado presente em Agnatha. Em teleósteos, a maioria das espécies descritas (50% - 80%) não possui miocárdio compacto e circulação coronária (tipo I) (SANTER e GREER WALKER, 1980; SANTER, 1985). Já as espécies que apresentam essas características, como os salmonídeos (PIEPERHOFF et al., 2009), teriam perdido a vascularização nas trabéculas, mantendo os vasos restritos à camada compacta (tipo II). Essa transição evolutiva dos tipos III e IV para o tipo II teria ocorrido em diversas linhagens de teleósteos. A prevalência de um miocárdio inteiramente trabeculado na maioria das espécies

descritas seria um reflexo da evolução do ventrículo em direção a uma menor dependência da circulação coronária (FARRELL et al., 2012).

Nossos resultados para o grupo Otophysi, considerando algumas famílias da subordem Characoidei e das ordens Siluriformes, Gymnotiformes e Cypriniformes, estão de acordo com as hipóteses de Farrell et al. (2012), uma vez que não detectamos vasos coronários nas trabéculas em nenhuma das espécies. Portanto, é possível inferir que em espécies do grupo Otophysi, o ventrículo tipo II é dominante até o momento, mas associado a diferentes formatos anatômicos.

Diante do exposto, surge o seguinte questionamento: quais fatores definem a morfologia ventricular em teleósteos? Nesse contexto, Tang et al. (2018) estudaram o desenvolvimento e a morfologia do coração em duas populações diferentes de *Astyanax mexicanus*, uma população de caverna e uma população de superfície. Ambas as populações apresentaram um ventrículo piramidal associado a um miocárdio misto, independentemente do hábito natatório. Contudo, a população de superfície, mais ativa, mostrou um ventrículo piramidal mais angular e uma proporção maior da camada compacta em comparação com a população de caverna de hábito sedentário. Essas diferenças morfológicas coincidiram com diferenças funcionais, com a população de superfície apresentando maior frequência cardíaca em relação à população de caverna. Ao acompanhar o desenvolvimento de ambas as populações em condições de laboratório, os autores perceberam que as diferenças morfológicas surgiam cedo no desenvolvimento e sem a influência de fatores ambientais. Por fim, ao realizar um cruzamento entre ambas as populações, notaram que a geração F1 apresentava uma mistura de ambos os fenótipos. Assim, concluíram que as características morfológicas do ventrículo estavam embutidas no genoma e eram geneticamente reguladas.

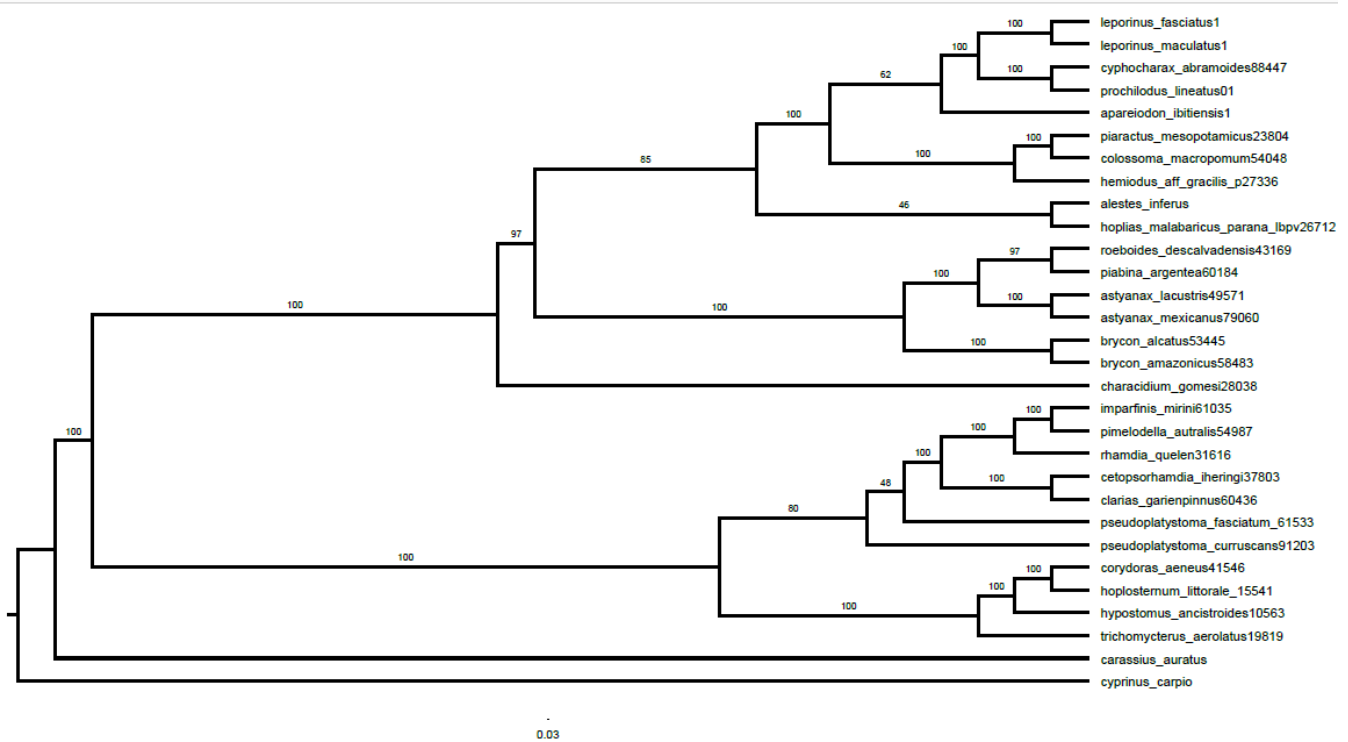
A possibilidade de que os caracteres morfológicos do ventrículo estejam fixados no DNA das espécies (Tang et al., 2018) seria uma possível explicação para a presença de um ventrículo piramidal tipo II em uma espécie de hábito sedentário como *Hoplias malabaricus* ou a presença de feixes musculares em diferentes orientações na camada compacta delgada de *Hypostomus ancistroides*, uma vez que esses caracteres poderiam ser herdados de um ancestral comum de hábito

ativo. De fato, neste estudo, não foi observada nenhuma variação da morfologia ventricular entre as espécies a nível de família.

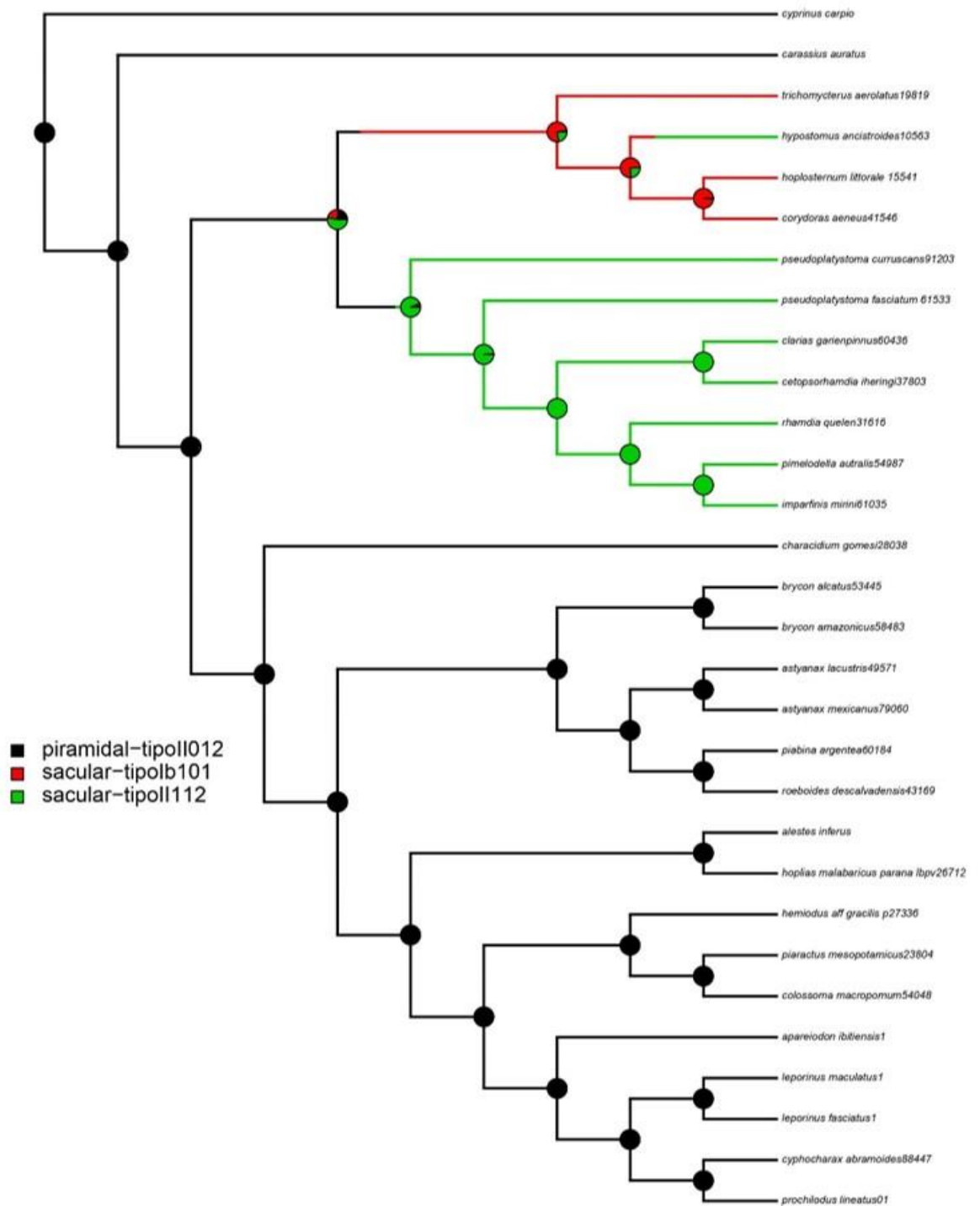
Os resultados descritos acima são de grande relevância para este estudo, pois demonstram que os caracteres morfológicos do ventrículo podem ser analisados dentro de um contexto filogenético. Para a análise da anatomia externa, mioarquitetura e vascularização por métodos filogenéticos comparativos, inicialmente foi proposta uma árvore filogenética contendo um total de 30 táxons a partir de uma matriz de 75% contendo 426.380 caracteres representando 1.469 UCEs, estimada sem partições e com o modelo GTR+G. Essas análises produziram uma filogenia com forte suporte para quase todos os nós, exceto em relações específicas onde o suporte de bootstrap caiu entre 40% e 70% (Fig. 38). Em seguida, foi feito o mapeamento dos caracteres discretos do ventrículo na filogenia por meio de SIMMAP (BOLLBACK et al., 2006), fornecendo um suporte probabilístico essencial para compreender a evolução da morfologia ventricular.

As análises de SIMMAP indicaram que o ventrículo piramidal tipo II representaria a condição ancestral no clado Otophysi (Fig. 39). Apesar de não estar presente na análise, Gymnotiformes teriam mantido o ventrículo piramidal tipo II, porém sofrido uma simplificação estrutural na camada compacta. O miocárdio misto associado a uma camada compacta composta foi mantido em Siluriformes, entretanto, nessa ordem, foi observado um maior número de combinações entre anatomia, mioarquitetura e vascularização.

Diante do exposto, é possível inferir que a evolução da espécie ancestral do grupo Otophysi teria ocorrido prioritariamente em ambientes lóticos e com migrações sazonais para reprodução, uma vez que esses fatores criariam uma pressão seletiva favorável para as características morfológicas observadas no ventrículo de Characoidei, Gymnotiformes e Cypriniformes. Por outro lado, o cenário evolutivo para as espécies da ordem Siluriformes aponta para uma maior diversificação nos hábitos de vida e ocupação de locais com diferentes condições ambientais, permitindo maiores combinações morfológicas do ventrículo em decorrência de diferentes necessidades metabólicas das espécies.



**Fig. 38:** Árvore de RAxML proposta a partir de uma matriz com 426.380 caracteres representando 1.469 UCEs, estimada sem partições e com o modelo GTR. A árvore foi posteriormente utilizada para análise com software SIMMAP.



**Fig. 39: Análise de SIMMAP feita a partir da filogenia proposta com UCEs de 30 espécies pertencentes a subordem Characoidei e ordens Siuriformes e Cypriniformes.** Na filogenia foi mapeado as seguintes morfologias ventriculares: ventrículo piramidal tipo II (preto), ventrículo sacular tipo Ib (vermelho) e ventrículo sacular tipo II (verde). A análise aponta para o ventrículo piramidal tipo II como a condição ancestral em Otophysi.

#### 4.4. Novas perspectivas e considerações finais

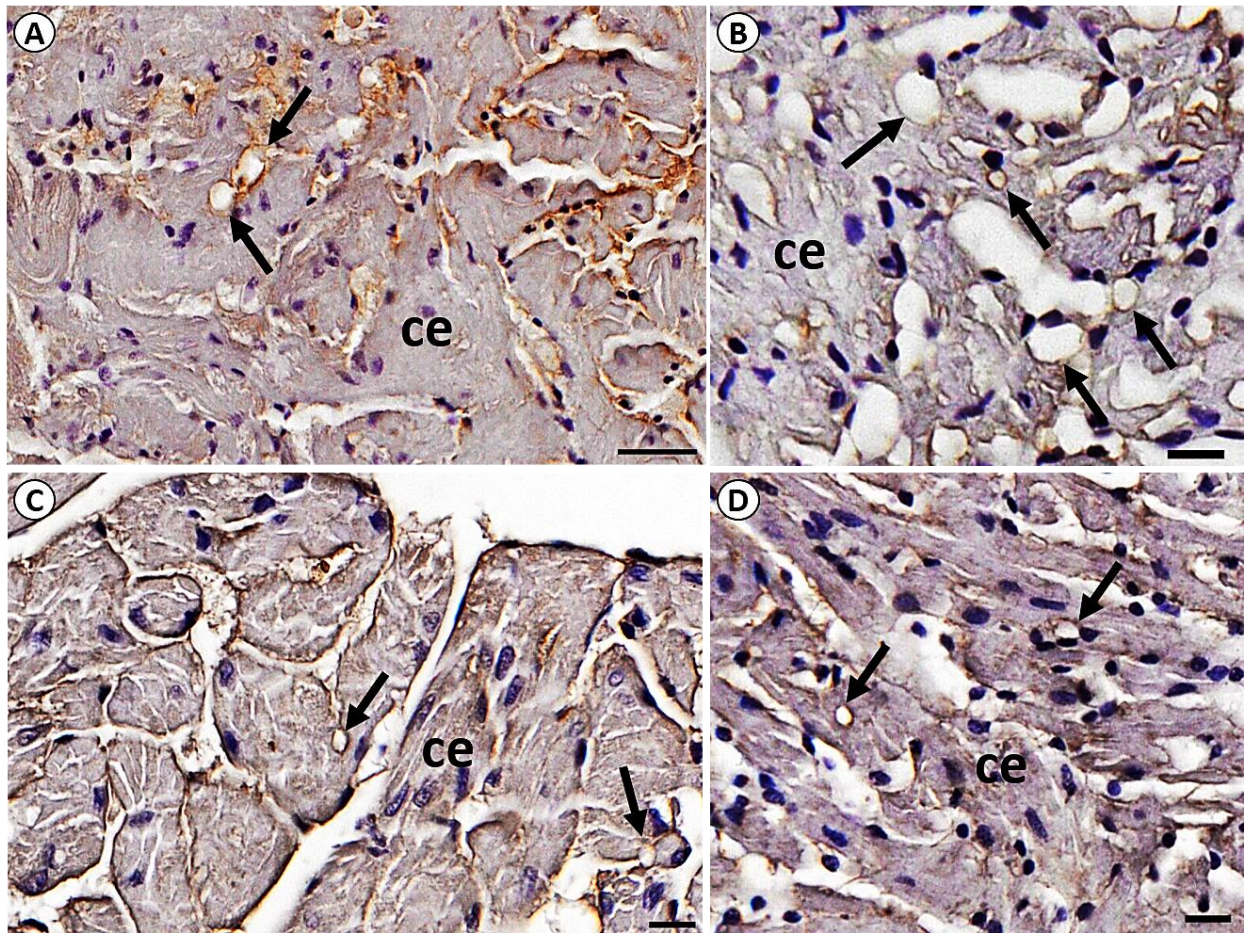
Esta seção apresenta os resultados parciais obtidos por meio da técnica de imuno-histoquímica, realizada em parceria com o Centro de Microscopia e Microanálises do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas do Campus de São José do Rio Preto. A imuno-histoquímica foi realizada com o anticorpo anti-CD34 (B-6) com o objetivo de averiguar de forma mais precisa a presença ou ausência de capilares sanguíneos na camada esponjosa do miocárdio ventricular das espécies estudadas, uma vez que, como descrito no item 4.1, não foi possível detectar de forma precisa os capilares por meio de técnicas de histologia básica.

Os resultados da imuno-histoquímica foram contrários ao descrito no item 4.1 por meio de histologia básica. O anticorpo reagiu positivamente com células endoteliais CD34 positivas localizadas no endocárdio e na parede dos capilares sanguíneos, revelando capilares sanguíneos na camada esponjosa do ventrículo de quatro espécies estudadas: *Piabina argentea*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Gymnotus cuia* e *Gyrinocheilus aymonieri*, pertencentes à subordem Characoidei e às ordens Siluriformes, Gymnotiformes e Cypriniformes, respectivamente (Fig. 40A-D). A presença de capilares sanguíneos na porção esponjosa do miocárdio significa que todo o miocárdio ventricular nessas espécies é vascularizado e se beneficia do sangue rico em oxigênio fornecido pela circulação coronária. Esses resultados fornecem um dado contrário à hipótese estabelecida na literatura (FARRELL et al., 2012; DURAN et al., 2015), na qual a evolução do miocárdio ventricular em teleósteos estaria caminhando em direção a uma menor dependência de circulação coronária no músculo cardíaco.

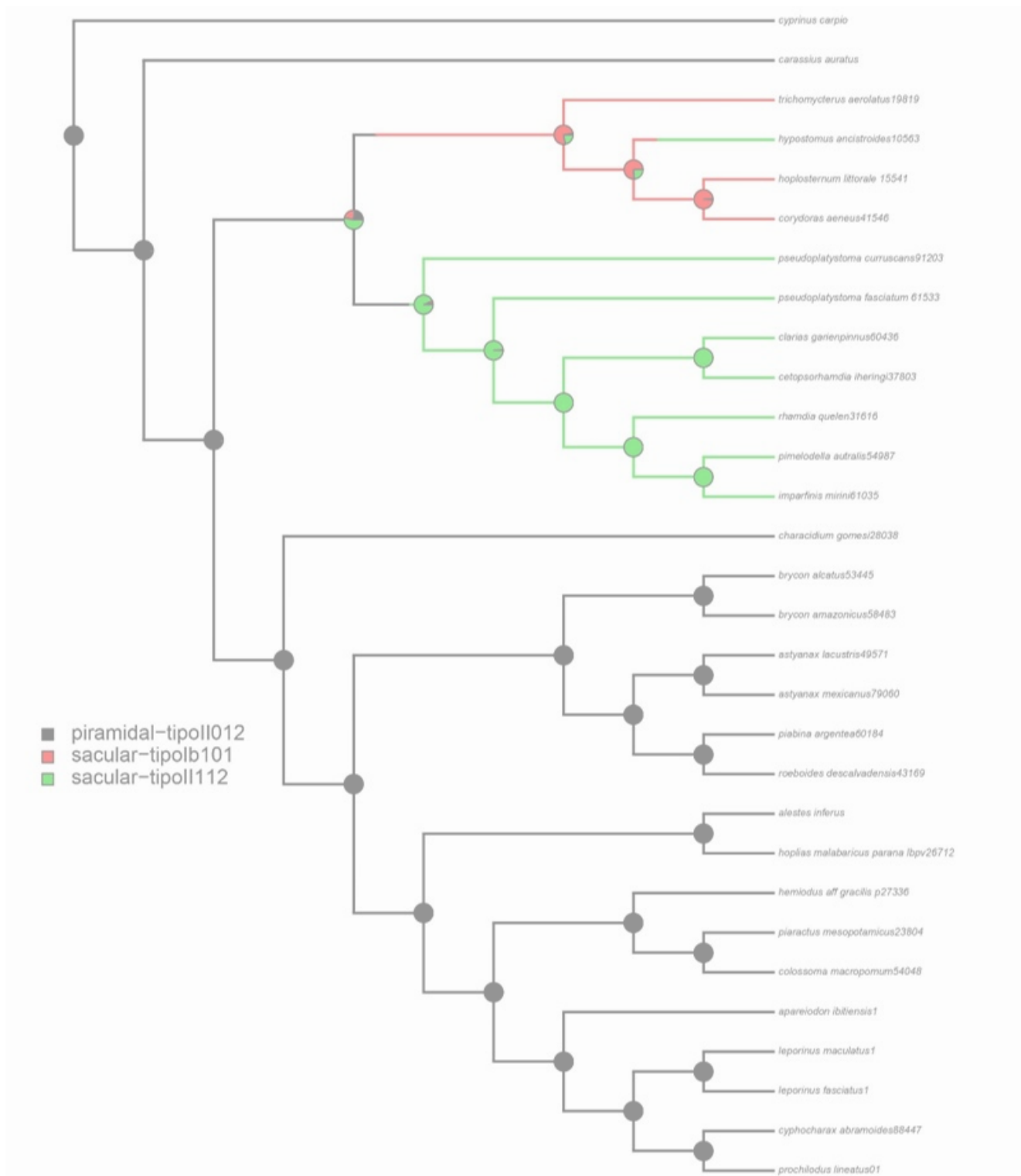
Em teleósteos, vasos coronários na camada esponjosa foram descritos apenas em espécies com alta demanda metabólica e endotermia parcial, como atuns e peixes espada (TOTA et al., 1983). Morfologicamente, o ventrículo das espécies citadas passaria a ser classificado como tipo III, em vez de tipo II. Apesar dos capilares observados na camada esponjosa serem mais discretos e menos expressivos em relação ao observado em teleósteos com alta demanda metabólica e em elasmobrânquios (COX et al., 2016a; COX et al., 2016b), pode-se inferir a respeito dos benefícios de manter a circulação coronária como uma via acessória para fornecer oxigênio ao músculo cardíaco, em adição à via luminal (DAVIE & FARRELL, 1991).

Por fim, esses resultados levantam os seguintes questionamentos: os capilares sanguíneos poderiam ser comuns na camada esponjosa de outras espécies das ordens que compõem o grupo Otophysi? A dificuldade em marcar e observar capilares na camada esponjosa sem o uso de um anticorpo adequado poderia ter levado a uma visão equivocada da literatura a respeito da ausência (Tipos Ia e Ib) ou restrição dos capilares à camada compacta (Tipo II)?

No total, a morfologia ventricular foi analisada em 28 espécies pertencentes ao grupo Otophysi. Juntamente com os dados de outras espécies, este estudo interpretou pela primeira vez a morfologia ventricular em teleósteos sob uma perspectiva evolutiva por meio de métodos filogenéticos comparativos. Nossos resultados forneceram um cenário inicial a respeito da evolução ventricular em espécies que compõem as principais ordens da região Neotropical e permitiram inferir a respeito da condição morfológica ancestral no ventrículo de Otophysi. Por fim, a técnica de imuno-histoquímica, que se mostrou muito eficiente na marcação de capilares sanguíneos no ventrículo de peixes, pode significar o próximo passo para a confirmação dos tipos ventriculares em teleósteos.



**Fig. 40:** Técnica de Imuno-histoquímica realizada com anticorpo anti-CD34 (B-6) revelando células endoteliais CD34 positivas em capilares sanguíneos na camada esponjosa do ventrículo de espécies do subclado Otophysi. O anticorpo reagiu positivamente com células endoteliais CD34 positivas localizadas no endocárdio e na parede dos capilares sanguíneos (setas). A: *Gyrinocheilus aymonieri*; B: *Gymnotus cuia*; C: *Piabina argentea*; e D: *Pseudoplatystoma corruscans*.



## 6. Referências

ABERER, A. J.; KOBERT, K.; STAMATAKIS, A. ExaBayes: massively parallel Bayesian tree inference for the whole-genome era. **Molecular Biology and Evolution**. v. 31, n. 10, p. 2553–2556, 2014. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/molbev/msu236>>.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press. P. 408, 2011.

BURGEE, W.; FARRELL, A.; LILLYWHITE, H.; Vertebrate cardiovascular systems. In: DANTZLER, W. H. (Ed.). **Handbook of physiology – comparative physiology**. Toronto: Oxford University Press Canada, 1997, p. 216-308.

CAMILLI, J. A. et al. L'étude morphologique du coeur du "poraquê" (*Electrophorus electricus*). **Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch**, Leipzig, v. 135, n. 4, p. 557- 565, 1989.

CLAIREAUX, G., et al. Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. **J Exp Biol**. v. 208(Pt 10), p. 1775-84, 2005.

COX, G. K.; KENNEDY, G. E.; FARRELL, A. P. Morphological arrangement of the coronary vasculature in a shark (*Squalus sucklei*) and a teleost (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Morphology**. Hoboken, v. 277, n. 7, p. 896-905, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmor.20543>>.

COX, G. K., et al. Determinants of coronary blood flow in sandbar sharks, *Carcharhinus plumbeus*. **Journal of Comparative Physiology B**. v. 187, p. 315-327, 2016.

DAVIE, P. S.; FARRELL, A. P. The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1993- 2001, 1991.

DIMITRIADI, A., et al. 3D heart morphological changes in response to developmental temperature in zebrafish: More than ventricle roundness. **Journal of Morphology**. v. 282, p. 80– 87, 2021.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**. v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>>.

DURÁN, A. C. et al. Chondrichthyans have a bulbus arteriosus at the arterial pole of the heart: morphological and evolutionary implications. **Journal of Anatomy**. v. 213, n. 5, p. 97–606, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00973.x>>.

DURÁN, A. C. et al. Structure and vascularization of the ventricular myocardium in Holocephali: their evolutionary significance. **Journal of Anatomy**. London, v. 226, n. 6, p. 501-510, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/joa.12317>>.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**. v.32, n.5, p.1792–1797, 2004. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>>.

FAIRCLOTH, B. C. Illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. 2013.

FAIRCLOTH, B.C. PHYLUC is a software package for the analysis of conserved genomic loci. **Bioinformatics**. v. 32, n. 5, p. 786-788, 2016.

FARRELL, A. P. The Wind-Kessel effect of the bulbus arteriosus in trout. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 209, n. 1, p. 169-173, 1979. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jez.1402090120>>.

FARRELL, A. P. et al. A perspective on the evolution of the coronary circulation in fishes and the transition to terrestrial life. In: SEDMERA, D.; WANG, T. (Ed.). **Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart**. New York: Springer, 2012. p. 75-102.

FARRELL, A. P.; JONES, D. R. The heart. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. (Ed.). **Fish physiology**: volume XII, part A: the cardiovascular system. San Diego: Academic, 1992. p. 1-88.

FARRELL, A. P. et al. A novel technique for estimating the compact myocardium in fishes reveals surprising results for an athletic air-breathing fish, the Pacific tarpon. **Journal of Fish Biology**. v. 71, n. 2, p. 389-398, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01496.x>>.

FARRELL, A. P.; PIEPERHOFF, S. Design and Physiology of the Heart: Cardiac Anatomy in Fishes. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology**. Canada: Vancouver Academic Press, 2011, p. 998-1005.

FARRELL, A. P.; SMITH, F. Cardiac form, function and physiology. **Fish Physiology**, Maryland Heights, v. 36, part A, p. 155-264, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.07.001>>.

GAMPERL, A. K.; FARRELL, A. P. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. **The Journal of Experimental Biology**. V. 207, p. 2539-2550, 2004.

GARDINAL, M. V. B. et al. Myocardium Arrangement and Coronary Vessel Distribution in the Ventricle of Three Neotropical Freshwater Teleosts. **Zoological Science**. v. 34, n. 4, p. 360 – 366, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2108/zs180022>>.

GARDINAL, M. V. B. et al. Heart structure in the Amazonian teleost *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimidae). **Journal of Anatomy**. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/joa.12919>>.

GARDINAL, M. V. B. et al. Histochemical characterization and connective fiber distribution of the cardiac outflow tract of pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes, Arapaimidae). **Zoomorphology**. v. 138, p. 525-534, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00435-019-00459-z>>.

GONÇALVES, M. T. D.; RECHE GARCIA, P. C.; GREMSKI, W. Estudo do coração de *Plecostomus commersonii* (Pisces): anatomia e microscopia eletrônica de

varredura. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 19, p. 101-120, 1990. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/acta/article/view/780/622>>.

GREER WALKER, M.; SANTER, R. M. Heart structure of some deepsea fish (Teleostei: Macrouridae). **Journal of Zoology**, London, v. 205, p. 75–89, 1985. Disponível em: <<https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7998.1985.tb05614.x>>.

GRIMES, A.C.; KIRBY, M. L. The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. **Journal of Fish Biology**. v. 74, n. 5, p. 983-1036, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>>.

HOCHACHKA, P. W. et al. Metabolic biochemistry of water-vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 56, n. 4, p. 736-750, 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/z78-103>>.

HOFFMANN, A. C.; NASCIMENTO, R. H. C.; SHIBATTA, O, A. Fish fauna from tributaries throughout the Tibagi River basin, upper Paraná basin, Brazil. **Check List: the journal of biodiversity data**. v. 11, n. 16, 2015. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/cl/article/view/11.6.1815>>.

ICARDO, J. M. et al. The heart of *Sparus auratus*: a reappraisal of cardiac functional morphology in teleosts. **Journal of Experimental Zoology part A: comparative experimental biology**, Hoboken, v. 303A, n. 8, p. 665-675, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.a.195>>.

ICARDO, J. M. Conus Arteriosus of The Teleost Heart: Dismissed, But Not Missed. **The Anatomical Record Part A**. v. 288, n. 8, p. 900-8, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ar.a.20361>>.

ICARDO, J. M.; COLVEE, E; The Atrioventricular Region of the Teleost Heart. A Distinct Heart Segment. **The Anatomical Record**. v. 294, n. 2, p. 236-242, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ar.21320>>.

ICARDO, J. M. The Teleost heart: a morphological approach. In: SEDMERA, D.; WANG, T. (Ed.). **Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart**. New York: Springer, 2012. p. 35-53.

ICARDO, J. M. et al. Morphological analysis of the hagfish heart. I. The ventricle, the arterial connection and the ventral aorta. **Journal of Morphology**. v. 277, n. 3, p. 326-40, 2016. Disponível em: <[doi: 10.1002/jmor.20498](https://doi.org/10.1002/jmor.20498)>.

ICARDO, J. M. Heart morphology and anatomy. **Fish Physiology**, Maryland Heights, v. 36, Part A, p. 1-54, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.05.002>>.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius stainings plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**. v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.

KARDONG, K. V. The Circulatory System. In: **Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution**. New York, The McGraw-Hill Companies. 2009, p. 451-503.

LECHNER, W. Herzspitze und Herzwirbel. **Anatomischer Anzeiger**. v. 92, p. 249-283, 1942.

LORENZALE, M. et al. The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians. **Biological Reviews**. v. 93, n. 3, p. 1604-1619, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/brv.12411>>.

MALDANIS, L. et al. Heart fossilization is possible and informs the evolution of cardiac outflow tract in vertebrates. **eLife**. v. 5:e14698, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.14698>>.

MORIYAMA Y, et al. Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. **Nature Communications**.v. 7, n.10397, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms10397>>.

MUNSHI, J. S. D. et al. Scanning electron microscopy of the heart of the climbing perch. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 59, n. 5, p. 1170-1180, 2001.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the World**. Hoboken: Springer, 2016, 601p.

OLSON, K. R. Circulatory system. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.). **The laboratory fish**. San Diego: Academic, 2000. p. 161-171.

PARSONS, C. W. The conus arteriosus of fishes. **Quarterly Journal of Microscopical Science**. v. 73, p. 145–176, 1930.

PIEPERHOFF, S.; BENNETT, W.; FARRELL, A. P. The intercellular organization of the two muscular systems in the adult salmonid heart, the compact and the spongy myocardium. **Journal of Anatomy**, London, v. 215, n. 5, p. 536-547, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-7580.2009.01129.x>>.

POPPE, T. T. et al. Heart morphology in wild and farmed Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, n. 1-2, p. 103-8, 2004.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A, XIE, et al. Tracer v1.6. 2014. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. O sistema cardiovascular. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p. 175-203.

REIS, R. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**. v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfb.13016>>.

ROWLATT, U. Funcional Morphology in the Heart of Mammals. **American Zoologist**. v. 8, p; 201-209, 1968.

ROXO, F. F.; OCHOA, L. E.; SABAJ, M. H. et al. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 135, p. 148-165, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.017>>.

SÁNCHEZ-QUINTANA, D. et al. Myocardial fiber and connective tissue architecture in the fish heart ventricle. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 275, n. 2-3, p. 112-24, 1996.

SÁNCHEZ-QUINTANA, D.; HURLE, J. M. Ventricular myocardial architecture in marine fishes. **The Anatomical Record**. v. 217, n. 3, p. 263-273, 1987.

SANS-COMA V, et al. Anatomy and histology of the cardiac conal valves of the adult dogfish (*Scyliorhinus canicula*). **The Anatomical Record**. v. 241, n. 4, p.496-504, 1995. Disponível em: <doi: 10.1002/ar.1092410407. PMID: 7604964>.

SANTER, R. M.; GREER WALKER, M. Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. **Journal of Zoology** v. 190. n. 2, p. 259-272, 1980.

SANTER, R. M. et al. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (teleostei). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Philadelphia, v. 76, n. 3, p. 453-457, 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90445-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90445-0)>.

SANTER, R. M. **Morphology and innervation of the fish heart**. Berlin: Springer, 1985. Advances in anatomy, embryology and cell biology, 89.

SANTOS, A. C.; GONÇALVES, C. C.; CARVALHO, F. R. Ictiofauna da Cachoeira de São Roberto e peixes do baixo rio Preto, bacia do alto rio Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**. v. 17, n. 1, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0196>>.

SATCHELL, G. H. A functional appraisal of the fish heart. **Federation Proceedings**, Washington, v. 29, n. 3, p. 1020-1023, 1970.

SATCHELL, G. H.; JONES, M. P. The Function of the Conus Arteriosus in the Port Jackson Shark, *Heterodontus Portusjacksoni*. **Journal of Experimental Biology**. v. 46, n. 2, p. 373–382, 1967. Disponível em: <doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.46.2.373>>

SANTINI, F.; HARMON, L. J.; CARNEVALE, G. et al. Did genome duplication drive the origin of teleosts? A comparative study of diversification in ray-finned fishes. **BMC Evolutionary Biology**. v. 9, n. 194, 2009. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-194>>.

SMITH, W. C. On the process of disappearance of the conus arteriosus in teleosts. **The Anatomical Record**, Hoboken, v. 15, n. 2, p. 65-71, 1918.

- SIMÕES, K. et al. Myoarchitecture and vasculature of the heart ventricle in some freshwater teleosts. **Journal of Anatomy**, London, v. 200, n. 5, p. 467–475, 2002.
- SCHIB, J. L. et al. The conus arteriosus of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). **Journal of Anatomy**, London, v. 201, n. 5, p. 395-404, 2002.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**. v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>>.
- TANG, J. L. Y. et al. The developmental origin of heart size and shape differences in *Astyanax mexicanus* populations. **Developmental Biology**, In press, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.06.009>>.
- TOTA, B. et al. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. **Journal of Anatomy**, London, v. 167, n. 1, p. 15-32, 1983. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aja.1001670103>>.
- TOTA, B. Functional cardiac morphology and biochemistry in Atlantic bluefin tuna. In: SHARP, G.D., DIZON, A.E. (Eds.). **The Physiological Ecology of Tunas**. New York: Academic Press, 1978, pp. 89–112.
- TOTA, B. Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 2, n. 2, p. 122-135, 1989.
- TOTA, B. et al. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. **Journal of Anatomy**, London, v. 167, n. 1, p. 15-32, 1983.
- TOUSSAINT, A. et al. Global functional diversity of freshwater fish is concentrated in the Neotropics while functional vulnerability is widespread. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 22125, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep22125>>.
- YAMAUCHI, A. Fine structure of the fish heart. In: BOURNE, G. (Ed.) **Heart and Heart-like Organs**, v. 1, 1980, p. 119-148.