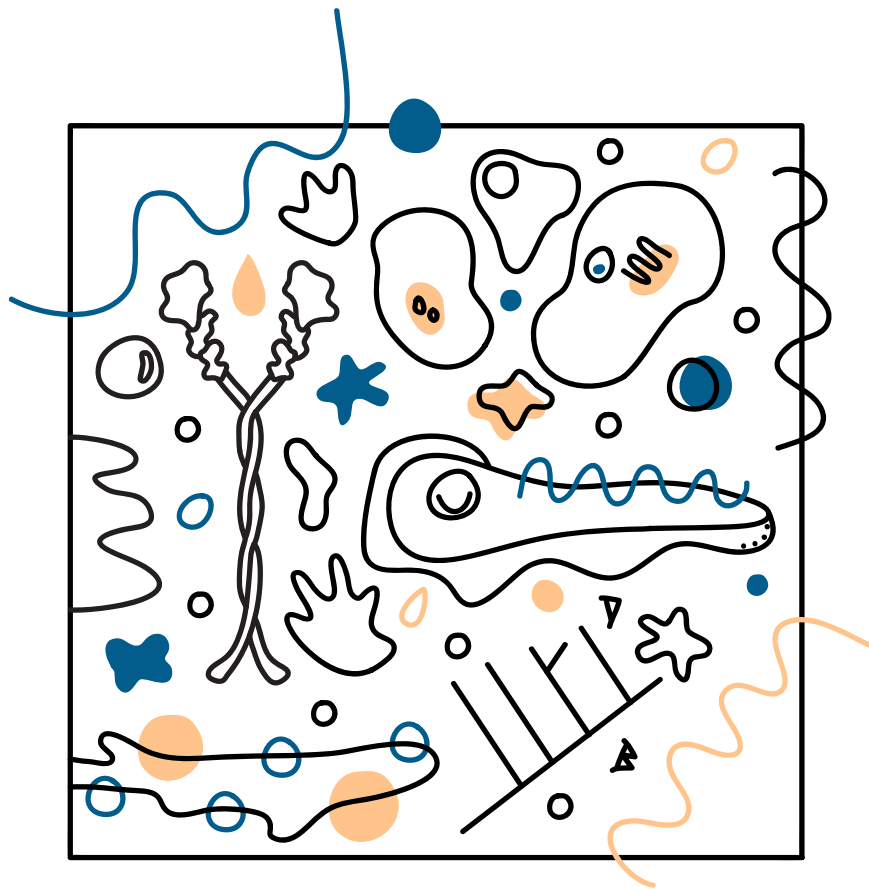




Tesis Doctoral

Organización, vascularización y desarrollo del miocardio en Condrictios

2021



Miguel A. López-Unzu López

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Programa de Doctorado en Diversidad
Biológica y Medio Ambiente
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga


Directores

Prof. Dra. Ana Carmen Durán Boyero
Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miguel Ángel López-Unzu López

 <http://orcid.org/0000-0002-8538-0713>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Tesis doctoral
2021

Organización, vascularización y
desarrollo del miocardio en Condrictios

Miguel A. López-Unzu López

Directores

Prof. Dra. Ana Carmen Durán Boyero
Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA Programa de Doctorado en Diversidad Biológica y Medio Ambiente



Departamento de Biología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga

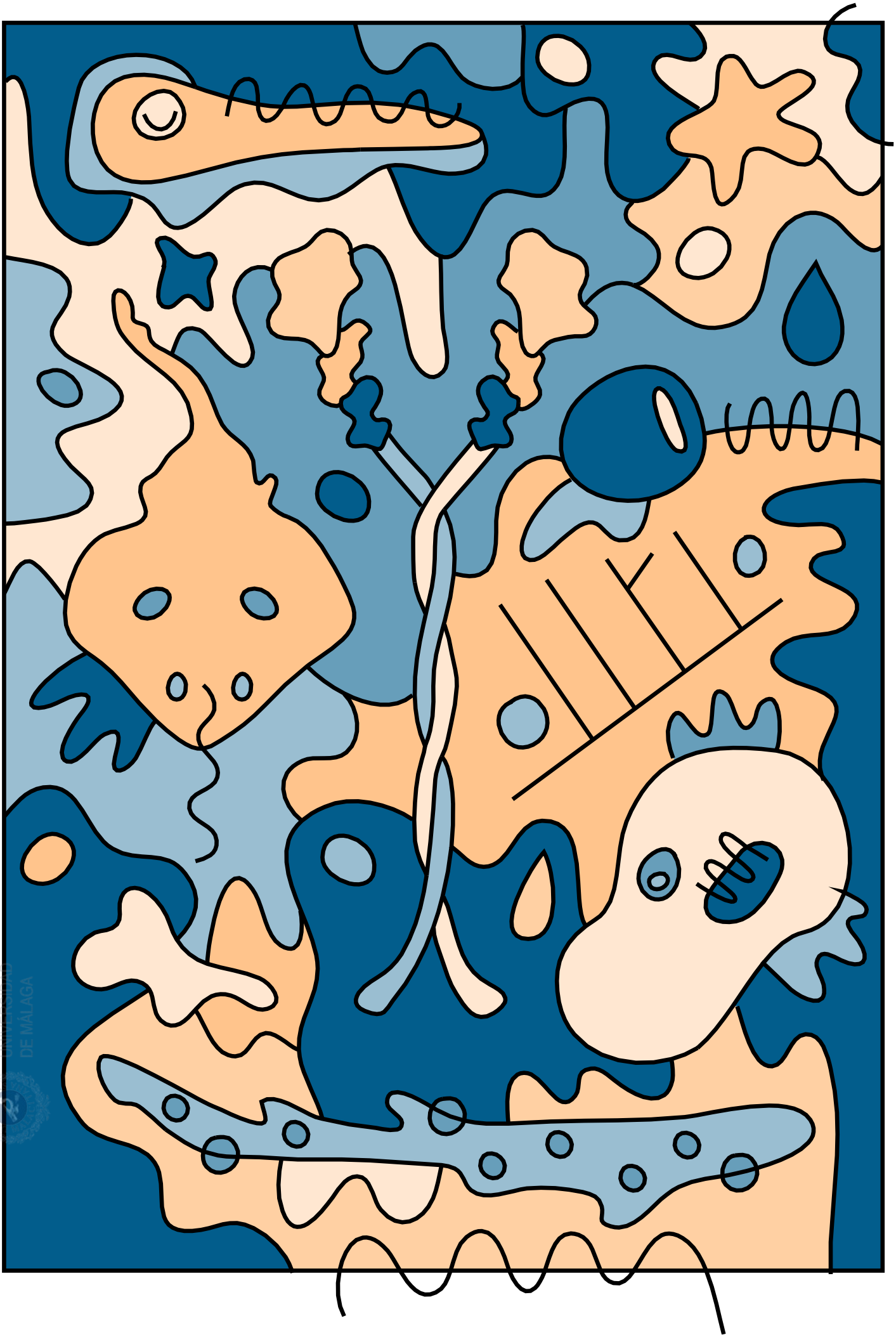


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres,
a Álvaro,
a mi abuela,
a Maite.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Per aspera
ad astra





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Animal

La Prof. Dra. Ana Carmen Durán Boyero, Catedrática de Zoología y el Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo, Profesor Titular de Zoología de la Universidad de Málaga

ACREDITAN:

D. Miguel Ángel López-Unzu López, graduado en Biología, ha realizado en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga las investigaciones contenidas en la siguiente memoria de Tesis Doctoral, titulada: “Organización, vascularización y desarrollo del miocardio en Condrictios”.

Como directores de la tesis, hacemos constar que las publicaciones que avalan la tesis no han sido utilizadas en tesis anteriores. Asimismo, consideramos que la presente memoria reúne todos los requisitos para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente, por lo que autorizamos su exposición y defensa pública para la obtención del Grado de Doctor con Mención Internacional.

En Málaga, a 8 de enero de 2021

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Prof. Dra. Ana C. Durán Boyero

Prof. Dr. Fco. Borja Fernández Corujo

Directores de la Tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ-UNZU LÓPEZ

Estudiante del programa de doctorado DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ORGANIZACIÓN, VASCULARIZACIÓN Y DESARROLLO DEL MIOCARDIO EN CONDRICTIOS

Realizada bajo la tutorización de PROF. DRA. ANA CARMEN DURÁN BOYERO y dirección de PROF. DRA. ANA CARMEN DURÁN BOYERO Y PROF. DR. FRANCISCO DE BORJA FERNÁNDEZ CORUJO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 8 de ENERO de 2021

Fdo.: MIGUEL A. LÓPEZ-UNZU LÓPEZ





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice

Resumen	5
Summary of the Thesis	7
Prefacio	23
Formato de la tesis	25
Aval y estructura de la tesis	25
Ámbito de ejecución de la tesis	26
Financiación de la tesis	27
Consideraciones éticas	28
Difusión y comunicación de resultados de la tesis	29
Otras publicaciones relacionadas con la tesis	31
Agradecimientos	35
I. Introducción	41
El sistema circulatorio de los vertebrados	43
El corazón de los vertebrados	44
<i>Anatomía del corazón</i>	44
<i>Histomorfología de los segmentos cardiacos</i>	50
<i>El sistema de conducción</i>	53
<i>La contracción cardiaca</i>	54
<i>El desarrollo embrionario del corazón</i>	59
Posición filogenética de los condrictios	62
Los condrictios como modelo animal de investigación	64
II. Objetivos generales	65

III. Estructura y vascularización del miocardio ventricular en los Holocéfalos: su significado evolutivo	69
Antecedentes	71
Resultados y discusión	72
IV. Expresión diferencial de isoformas de cadena pesada de miosina en los segmentos cardiacos de vertebrados gnatostomados y sus implicaciones evolutivas	75
Antecedentes	77
Resultados y discusión	78
V. Isoformas de cadena pesada de miosina en el miocardio atrioventricular de <i>Scyliorhinus canicula</i>	83
Antecedentes	85
Resultados y discusión	86
VI. Desarrollo de las trabéculas ventriculares en <i>Scyliorhinus canicula</i>: Implicaciones evolutivas	89
Antecedentes	91
Resultados y discusión	92
VII. Discusión general	95
Evolución del miocardio ventricular y su vascularización	98
Evolución del desarrollo del miocardio ventricular	103
Evolución del miosinoma cardiaco	104
Evolución de la contracción y el tracto de salida cardiacos	107
VIII. Conclusiones / Conclusions	111
Bibliografía	117
Artículos originales	135

Resumen Summary





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen

Actualmente se acepta que el corazón de los condriictios refleja fielmente la condición primitiva de los gnatostomados. En la presente tesis se han estudiado diferentes aspectos de la morfología, la composición molecular y el desarrollo embrionario del corazón de los condriictios. Adicionalmente, se ha comparado cada uno de estos aspectos con respecto a otros grupos de vertebrados, con el objetivo de indagar en la evolución de la mioarquitectura y la vascularización del corazón de los gnatostomados.

La primera cuestión versa sobre la histomorfología del miocardio ventricular en los gnatostomados. Se describió la mioarquitectura ventricular de cuatro especies de holocéfalos: *Chimaera monstrosa*, *Hydrolagus affinis*, *Harriotta raleighana* y *Rhinochimaera atlantica*. Los holocéfalos constituyen el grupo hermano de los elasmobranquios, junto con los que conforman los condriictios, el grupo hermano del resto de gnatostomados. Los resultados obtenidos confirman que la mioarquitectura mixta debe ser considerada como la condición primitiva en gnatostomados. Por lo tanto, las mioarquitecturas ventriculares compacta y trabeculada son condiciones derivadas. Además, la peculiar vascularización cardíaca en algunas especies estudiadas ha permitido formular nuevas hipótesis sobre la asociación entre mioarquitectura e irrigación coronaria y sobre la variabilidad de tipos morfológicos de mioarquitectura en los gnatostomados.

La segunda cuestión pivota sobre la composición en isoformas de cadena pesadas de miosina (MyHC) del corazón de los gnatostomados. Se realizó, por una parte, análisis proteómicos del miocardio del elasmobranquio *Scyliorhinus canicula*, y por otra, estudios inmunohistoquímicos en dicha especie y en otras pertenecientes a grupos representativos de gnatostomados. Los resultados permiten concluir que la abundancia de isoformas rápidas de MyHC en el miocardio de la región cardíaca de entrada y de isomiosinas lentas en la región cardíaca de salida es una sinapomorfía de los gnatostomados. Además, se han identificado dos isomiosinas (MYH2 y MYH7B) adicionales a las MyHC cardíacas convencionales descritas en tetrápodos y teleósteos

(MYH6 y MYH7) y se propone un modelo sobre la evolución de su expresión en distintos segmentos del corazón de los vertebrados. La distribución de estas isoformas en el miocardio del segmento atrioventricular, interpuesto entre el miocardio de las regiones de entrada y de salida, sugiere su función en la sincronización de la contracción cardiaca en vertebrados que carecen de un sistema de conducción especializado, como es el caso de *S. canicula*.

La tercera y última cuestión trata sobre el desarrollo del miocardio ventricular en el corazón primitivo de los gnatostomados. Hasta la fecha se han descrito dos modelos de formación de las trabéculas cardiacas (trabeculación) durante el desarrollo embrionario: uno en teleósteos, que en general poseen un miocardio ventricular trabeculado, y el otro en tetrápodos, con una mioarquitectura compacta. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que en *S. canicula*, con un miocardio mixto, su trabeculación se asemeja a la de los tetrápodos, con mioarquitectura compacta. Por lo tanto, se propone que el mecanismo de trabeculación se ha conservado desde grupos basales de vertebrados hasta aves y mamíferos, mientras que, en los teleósteos, con mioarquitectura trabeculada, este mecanismo es derivado.

Palabras clave: Evolución; Gnatostomados; Condrictios; Corazón; Miocardio; Cadena pesada de miosina.

Summary of the Thesis

Background

Vertebrates are classified into two large groups, gnathostomes and agnathans. Within the gnathostomes, the chondrichthyans have been classically considered the sister group of the taxa constituted by sarcopterygians and actinopterygians (Carroll, 1988; Vekatesh et al., 1999; Zardoya, 2001; Broughton et al., 2013). Chondrichthyans are the oldest gnathostome taxon, which diverged from the common ancestor of osteichthyans in the early Silurian (Meyer and Zardoya, 2003; Takeaki et al., 2003; Blair and Hedges, 2005). Despite the technical limitations of using chondrichthyans as animal models, they are considered a crucial group to understand the evolution of the vertebrate organic systems. Therefore, the purpose of this study is to use different representative species of chondrichthyans, compared to representative species of other gnathostomes, to shed light on certain questions about the evolution of the heart.

At the morphological level, the cardiovascular system is one of the most diverse systems in vertebrates. The heart is a muscular organ that collects and pumps blood in the circulatory system. Considering the number of times that the blood circulates through the heart each time the circuit is completed, two main types of circulatory systems are distinguished in vertebrates: simple and double. The heart can be aligned into cardiac segments which display a variable histomorphology. Despite its differences, all of them are constituted by a muscular wall that delimits the cardiac lumen through which blood circulates. The heart is endowed with valves which prevent backflow into the chambers (Pérez-Pomares et al., 2009). Cardiac segments have been grouped according to functional criteria in two hemodynamic regions: the inflow and outflow cardiac regions. The inflow is constituted by segments that receive blood from veins. Outflow region groups together the segments that eject blood through the main arteries (Simoes-Costa et al., 2005).

Considering the spatial disposition of the cardiac segments, two main types of cardiac designs can be identified in vertebrates, septated and non-

septated hearts. This study will focus on chondrichthyans because they are believed to faithfully reflect the most primitive anatomical design of this organ in gnathostomes including a non-septated heart. The non-septated heart is made up of six cardiac segments, arranged in series and with an "S" shape, namely sinus venosus, atrium, atrioventricular region, ventricle, conus arteriosus and bulbus arteriosus. Both the conus arteriosus and the bulbus arteriosus constitute the cardiac outflow tract ([Grimes and Kirby, 2009](#)).

The sinus venosus is the most posterior segment of the heart, it connects anteriorly with the atrium through the sinoatrial valve complex ([Santer and Cobb, 1972](#); [Ramos et al., 1996](#)). The atrium is in continuity with the ventricle through an intermediate segment called the atrioventricular region that supports a valve complex. The ventricle and the outflow tract constitute the so-called cardiac outflow hemodynamic region. The ventricle is the main contractile segment of the heart contributing the most to cardiac function ([Santer and Cobb, 1972](#)). The cardiac outflow tract is placed anteriorly to the ventricle and formed by two cardiac segments, the conus and the bulbus arteriosus.

At the histological level, the wall of each cardiac segments has three layers: the endocardium, a middle layer and the epicardium. The endocardium is a monostratified epithelium that lines internally the cardiac lumen. Its outer face contacts the subendocardium, which is located between the endocardium and the middle layer of the cardiac wall, the myocardium. One exception is the bulbus arteriosus, which does not contain cardiomyocytes in its wall. When present, the myocardium is the thickest component of the cardiac wall. It is made up of striated muscle fibers that are responsible for the contractile function of the heart. Finally, the epicardium is the outer layer of the heart. It is a monostratified epithelium that borders externally with the pericardial space and internally with the subepicardium, which is located between the epicardium and the middle layer of the wall ([Pérez-Pomares et al., 2009](#)).

Double circulatory systems with septated hearts represent an evolutionary novelty within vertebrates. This hypothesis is supported by different evidence. Firstly, septated hearts and double circulatory systems are mainly present in tetrapods, being both characters considered synapomorphies of sarcopterygians ([Simoes-Costa et al., 2005](#)). Secondly, during the cardiac development of all

tetrapods, the anatomy of the early embryonic heart resembles that of a linear non-septated heart (England and Loughna, 2018).

Although the morphology, molecular identity and development of the heart of conventional animal models have been studied in great depth, different questions about the primitive design of the heart of gnathostomes still remain unsolved. Given that the primitive cardiac design is faithfully reflected in the chondrichthyan circulation system, this study has aimed to analyze and compare with other animal models the morphology, molecular composition and embryonic development of this organ. The results have shed light on the evolution of the ventricular myoarchitecture, the distribution of cardiac myosin heavy chain isoforms, the cardiac contraction, and the development of the ventricular myocardium in gnathostomes.

Taking this into account, the objectives of this thesis are three. Firstly, to describe the myoarchitecture and ventricular vascularization of chondrichthyans to infer the primitive condition of the character and determine its evolution in gnathostome vertebrates. Secondly, to find out the distribution of myosin heavy chain isoforms in the heart in adult individuals of a representative of the elasmobranchs, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*), as well as in other species belonging to other groups of gnathostomes in order to deduce the evolution of the character within the gnathostome vertebrates. Finally, to study the early development of the mixed ventricular myocardium in the lesser spotted dogfish, in order to clarify the most primitive type of myocardial trabeculation in gnathostome vertebrates.

Evolution of the ventricular myoarchitecture

Classically, three histomorphological types of myocardium or myoarchitectures have been described in vertebrates: trabeculated, compact and mixed. The trabeculated myocardium shows deep recesses (intertrabecular spaces) presenting an endocardial lining. The compact type is composed of densely arranged myocardial fibers, without any trabeculae. Finally, the mixed type consists of two layers, an external compact layer and an internal trabeculated layer. The proportion of the two layers varies among the different groups of

vertebrates with mixed myocardium (Tota et al., 1983; Santer, 1985; Tota, 1989; Davie and Farrell, 1991; Agnisola and Tota, 1994; Grimes and Kirby, 2009; Farrell et al., 2012).

Currently, there is a discussion about which of these myoarchitectures constitutes the primitive condition in gnathostomes. Classically, the trabeculated ventricular myocardium, supplied by luminal blood, has been assumed to be the primitive myoarchitecture of gnathostomes (MacKinnon and Heatwole, 1981; Farmer, 1997, 1999). At the phylogenetic level, it has been shown that agnathans, the sister group of gnathostomes, have a trabeculated and avascular ventricle (Yamauchi, 1980). At the developmental level, early trabeculation occurs before the formation of the compact myocardium (Sedmera et al., 2000; Sedmera and Ostadal, 2012). Later, Farrell et al. (2012) proposed an alternative evolutionary scenario in which, although the primitive condition of vertebrates was the trabeculated and avascular ventricular myoarchitecture, the primitive condition of gnathostomes must have been the mixed and coronary-supplied myocardium.

In the present thesis, the question of which ventricular myoarchitecture can be considered primitive in gnathostomes was approached by describing the ventricular myoarchitecture of four species (*Chimaera monstrosa*, *Hydrolagus affinis*, *Harriotta raleighana* and *Rhinochimaera atlantica*), belonging to the Holocephali, the sister group of elasmobranchs (Durán et al., 2015). The results showed that the ventricular myocardium of *H. raleighana* and *C. monstrosa* are mixed, with a relatively thin compact layer. Between the compact layer and the epicardium, a subepicardial space with abundant collagen and elastin is observed. The coronary system runs through the outflow tract up to the conoventricular limit, in which it divides into multiple branches that supply the entire ventricle. *R. atlantica* has a ventricle lacking compact myocardium and with a subepicardium with abundant collagen and elastin. The coronary trunks also run through the outflow tract of this species, but they only give rise to subepicardial branches, which do not penetrate the myocardium. Finally, the ventricle of the *H. affinis* specimens studied in this work present a completely trabeculated myocardium. The coronary trunks in this species also run through

the outflow tract until it reaches the conoventricular limit, where it divides into multiple subepicardial coronary arteries that penetrate the trabecular layer.

The finding in *H. affinis* represents new evidence that the development programs of both traits (coronary irrigation and proliferation of the compact myocardium) in vertebrates are independent, although they are closely linked (Lavine et al., 2008). Given that the remaining family of holocephalan, Callorhynchidae, has a mixed-type ventricular myocardium (Davie and Farrell, 1991), we can conclude that the primitive ventricular myoarchitecture in gnathostomes is the mixed one with coronary irrigation. For this reason, the absence of compact ventricular myocardium and/or the lack of a coronary system that supplies it must be attributed to a secondary loss.

The impossibility to categorize the ventricular myoarchitecture of *H. affinis* highlights a problem with the classification proposed by Tota et al. (1983). The main problem comes from the lack of consensus on how to discriminate a mixed type myocardium from a purely compact or trabeculated one. In fact, all compact myocardia described in vertebrate hearts have a reduced trabeculated layer on their luminal face. In addition, all trabeculated ventricular myocardia are externally surrounded by a minimal and continuous layer of non-trabeculated myocardium. We propose that the different ventricular myoarchitectures of vertebrates should be considered expressions of an anatomical continuum, which goes from a myocardium formed by an extremely thin compact and a thick trabeculated layers (e.g., zebrafish) to a myocardium composed of a well-developed compacta and a small-sized trabeculated layer (e.g., mouse). Consequently, the concepts of spongy myocardium and compact myocardium should be avoided. In this context, another feature that should be considered to describe the ventricular structure is the blood supply to the ventricular wall. As Tota et al. (1983) pointed out, when describing the ventricular myoarchitecture of fish-like vertebrates, the absence or presence of coronary arteries and, in the latter case, the distribution of the vessels constitutes an ideal character to establish different myocardial patterns. This new classification of the ventricular myoarchitecture would not change the evolutionary hypothesis proposed in this thesis, regarding the morphological variation of the ventricular myocardium in gnathostomes. All the myocardial types observed in gnathostomes would come

from a primitive condition, characterized by a mixed type myocardium with a relatively thick compact layer and conspicuous coronary blood supply.

However, the findings in [Durán et al. \(2015\)](#) do not allow to conclude which ventricular myoarchitecture is the primitive one in vertebrates. As agnathans, considered as a clade, have a trabeculated and avascular ventricular myocardium, two evolutionary scenarios could explain the evolution of ventricular myoarchitecture. The first is that the current agnathans (myxines and lampreys) show a derived condition with respect to the common ancestor with the gnathostomes. The second is that the mixed condition is an autapomorphy of gnathostomes.

Evolution of the myosin heavy chain cardiac isoforms distribution

Cardiac contraction is caused by shortening of the sarcomeres, which are mostly composed of actin and myosin. Myosins are motor proteins responsible for the movement leading to sarcomere shortening ([Sellers, 2000](#)). By hydrolyzing ATP, myosins change their structural conformation, causing a synchronous movement that causes the actin fibers to shrink and the myofibrils to contract. Subsequently, myosin recovers its initial conformation, ultimately causing the sarcomere to stop contracting ([Risal et al., 2004](#)). Myosin heavy chains (MyHC) are the largest peptides within the myosin protein. Its structure is made up of a globular head and a tail. The globular head, which is localized at the N-terminal end, connects via the neck region with a long tail. The head is the motor portion, it performs ATPase functions and interacts with actin fibers. The tail region intertwines with another MyHC, forming functional dimers ([Sellers, 2000](#)).

Four isoforms of MyHC had been described in the myocardium of mammals: MYH3, MYH6, MYH7 and MYH7B ([England and Loughna, 2013](#)). These isoforms differ in their contraction speed and contractile activity ([Nikitina et al., 2015](#)). These differences allow the classification of MyHCs into fast-twitch/fast-fiber myosins, such as MYH6, or slow-twitch/fast-fiber myosins isoforms, such as MYH7 and MYH7B. Based on the data obtained in mammals, there are MyHC isoforms that are only found in specific locations and developmental time points, such as MYH3 and MYH7B that are expressed only

during cardiac development or MYH6 and MYH7, which are also located in adult myocardium. MYH6 (α -MyHC) is more abundant at the inflow region whereas MYH7 (β -MyHC) is more abundant at the outflow region (England and Loughna, 2013). The amphibian heart represents an exception to this MYH6/MYH7 pattern by expressing another slow isoform (MYH15) as the main outflow region isomyosin (Garriock et al., 2005).

Noting that there is some diversity in the identity of cardiac isomyosins, a study of their distribution in the chondrichthyan *S. canicula* was attempted in López-Unzu et al. (2019). This study is based on preliminary immunohistochemical results using two anti-pan-MyHC antibodies, MF20 and A4.1025, in heart samples from adult dogfish. Even though both antibodies theoretically detect the same isomyosins, the results obtained showed that only the myocardium of the venous sinus and the atrium were reactive to A4.1025 (inflow hemodynamic region). In order to verify the specificity of the antibodies for dogfish MyHC, both antibodies were used in western blot experiments using myosin extracts from the cardiac inflow and outflow of this species. As a control, a mammalian model, the hamster (*Mesocricetus auratus*) was used. Two main results were obtained: 1) the blots only revealed a single band in all the extracts of both species with a molecular weight that coincides with that described for the MyHC and 2) the cardiac outflow extract showed the same decrease in the antibody signal as that observed using immunohistochemistry. In order to quantify the difference in A4.1025 signal intensity between the dogfish cardiac inflow and outflow, a slot blot was performed with colorimetric tests. The results showed a high statistically significant ($p = 0.00001$) difference when using the A4.1025 antibody while the MF20 antibody revealed no significant difference ($p = 0.74183$).

To identify the specific MyHC isoforms differentially expressed in the cardiac outflow of dogfish, proteomic techniques were applied. These isoforms were initially identified using an HPLC-ESI-MS/MS system. Mass spectrometry data were compared to the only comprehensive protein database for chondrichthyans, that of the holocephalan *Callorhinchus milii* (Vekantesh et al., 2014). Four sarcomeric isoforms were detected, the expected conventional MYH6 and MYH7 and two additional unexpected isoforms, MYH2 and MYH7B.

These data were checked against a general chordate database. Because the difference was not qualitative, but quantitative, a more precise and sensitive system with the capacity to quantify peptides (ESI-Quadrupole-Orbitrap) was used. After searching the same *C. milii* database, this system identified the same four isoforms. However, the quantification indicated certain differences, since the MYH2 and MYH6 represented approximately 75% of the total cardiac inflow MyHC, whereas MYH7 and MYH7B represented approximately 70% of the total cardiac outflow isomyosins. These results suggest that the cardiac myosinome in vertebrates, as occurs during the maturation of other specialized skeletal fibers ([Schiaffino & Reggiani, 2011](#)), has evolved from a complex set of isomyosins (MYH2, MYH6, MYH7 and MYH7B) to a pattern with a reduced number of MyHC isoforms as observed in the hearts of zebrafish, birds and mammals (MYH6 and MYH7).

The findings obtained using quantitative proteomic techniques raise two questions. On the one hand, the results do not explain why phylogenetically distant groups such as tetrapods and teleosts share the same distribution of cardiac MyHC isoforms (MYH6 and MYH7). The morphology and contraction of both types of heart is completely different, as it is a non-septated heart in the case of zebrafish, and a completely septated heart in the case of birds and mammals. It is worth noting that birds and mammals are endothermic vertebrates, which means that they can maintain their body temperature regardless of the environment. Although evolutionarily endothermy appeared independently in Archosauromorpha (birds) and Therapsida (mammals) ([Faure-Brac and Cubo, 2020](#)), the transition to endothermy is associated with common cardiac adaptations in both groups, such as an increase in the ability to heart pumping ([Kroneman et al., 2018](#)). Unlike birds and mammals, the zebrafish is not endothermic. However, it lives in warm environments and is relatively active. Thus, it can be suggested that there is a causal relationship between cardiac isomyosin set and body temperature.

The other question that remains unanswered concerns the detection of MYH2 and MYH7B in the heart of adult chondrichthyans. The expression of MYH2 in the heart of vertebrates is restricted to the development of Purkinje fibers ([Machida et al., 2002](#)). We suggest that this isomyosin has lost its

contractile function in the myocardium throughout the evolution of vertebrates, being its function restricted to the development of the cardiac conduction system.

In the heart of birds and mammals, MYH7B is restricted to the embryonic development while in the adult, only its nested microRNA (MiR-499) is expressed to regulate fast muscle differentiation through the Sox6 pathway. The ectopic expression of this isoform causes different congenital heart diseases in humans (Peter et al., 2019). The identification of an animal model that expresses MYH7B in its adult myocardium can be a valuable tool in the study of these rare heart diseases.

Finally, to study the A4.1025 affinity for the different cardiac isomyosins, immunoprecipitation studies were performed. These experiments concluded that A4.1025 has a high affinity for the fast isoforms MYH2 and MYH6, being more than double than the affinity for MYH7 and tenfold higher than that for MYH7B.

With these data, A4.1025 was used in immunohistochemical techniques with heart samples from other groups of vertebrates. The results were that in teleosts (*Danio rerio* and *Osteoglossum bicirrhosum*), acipenseriformes (*Acipenser naccarii*) and mammals (*Mesocricetus auratus*) A4.1025 marks the entire myocardium while chondrichthyans (*Leucoraja circularis* and *Centrophorus granulosus*) present the same pattern as that observed in lesser spotted dogfish. A third type of pattern was observed in samples from the heart of *Polypterus senegalus*, in which the myocardium of the sinus venosus, atrium and conus arteriosus was intensely marked, while that of the ventricle did not show any reaction. Taking these results together, it can be concluded that the condition detected by proteomic analysis in dogfish, with four cardiac isoforms of MyHC, is surely shared by the rest of the chondrichthyans. This distribution differs from that described in tetrapods and teleosts, which seem to share the pattern of two conventional cardiac isoforms with *A. naccarii*. On the other hand, *Polypterus* presents a different pattern compared to the rest of vertebrates, as it has a conus arteriosus with a high concentration of fast isoforms.

Our results suggest that the presence of MYH7B in hearts with a primitive design (non-septated hearts with a long conus arteriosus) may be related to the “peristaltoid” contraction of the outflow region. While the atrium and ventricle

function as fast-twitch and isometric synchronous segments, the conus arteriosus is a slow-twitch, “peristaltoid” segment. Conal contraction has been related to three possible functions: 1) “accessory cardiac chamber” (Sudak, 1965), 2) blood pressure reservoir, which helps to minimize pressure fluctuations by protecting the branchial vessels (Keith, 1924; Daniel, 1934) and 3) to allow the correct function of the conal valves (Satchell and Jones, 1967; Schib et al., 2002). To confirm that there is a functional relationship between MYH7B expression and the type of cardiac contraction, it is necessary to study the cardiac isomyosin set of hearts with a primitive design and others with a reduced/absent conus arteriosus. To select the most suitable gnathostome groups for this study, the results of the work by Maldanis et al. (2016) are especially relevant. They show that the cardiac outflow tract of gnathostomes has undergone a progressive reduction in the number of rows of conal valve, specifically in three groups of actinopterygians: acipenseriformes, ammiiformes and teleosts.

Evolution of the cardiac contraction

Contraction of cardiac segments occurs sequentially in all types of hearts described in vertebrates due to the intervention, in most cases, of a conduction system. In chondrichthyans and actinopterygians, however, a sequential contraction is also observed without any morphological component of the conduction system. That is, a complete set of bundles and nodes that synchronize cardiac contraction has not been identified in the hearts of non-tetrapod gnathostomes. Another anatomical difference between the hearts of amniotes and anamniotes, with respect to cardiac conduction, is the lack of electrical isolation in the latter. It has been described that both birds and mammals have a fibrous-fatty tissue in the atrioventricular region, which slows down the electrical signal that triggers the myocardial contraction and favors the segment synchronization. In the rest of gnathostomes, including chondrichthyans, the atrioventricular myocardium is continuous with the atrial and ventricular myocardia, preventing morphological isolation between both cardiac hemodynamic regions (Jensen et al., 2012). The mechanism underlying the synchronization of cardiac contraction in chondrichthyans and, therefore, in the hypothetical primitive heart of gnathostomes is still unknown.

To obtain further information on the mechanism that allows a sequential cardiac contraction in a non-septated heart, we studied the distribution of MyHC isoforms in the atrioventricular region of *S. canicula*. At the tissue level, the atrioventricular myocardium is in continuity with the trabecular myocardium of the atrium and the trabeculated layer of the ventricle. This continuity has been observed in other species lacking a specialized cardiac conduction system, such as teleosts and tetrapods (*Xenopus laevis*) (Icardo and Colvee, 2011; Jensen et al., 2012). A4.1025 labels the sinus venosus and the atrial myocardium. However, the ventricular and conal myocardia are not reactive, except for a small portion in the apex of the ventricle. The atrioventricular myocardium is compact and abundantly supplied by branches of the left ventricular coronary artery. Circumferentially arranged myocardial fascicles are surrounded by a network of collagen, similar to the muscular interstitium of the atrium or ventricle.

The immunohistochemical results with A4.1025 show that the atrioventricular myocardium is divided at the molecular level into two portions, an atrial portion reactive to the antibody and a ventricular one that is negative. Taking into account the results obtained by López-Unzu et al. (2019), we can assume that the atrial portion of the atrioventricular region must have a greater abundance of fast isoforms of MyHC such as MYH2 and MYH6, while the ventricular portion must have a high concentration of slow isomyosins (MYH7 and MYH7B). This observation suggests that the contraction pattern differs in each portion, being the atrial portion continuous with the contraction of the inflow and the ventricular portion continuous with that of the outflow. Taking together, these results suggest that the distribution of fast and slow isoforms at both cardiac hemodynamic regions of vertebrates may serve to ensure synchronous cardiac contraction in hearts without a conduction system (including tetrapod embryos).

Evolution of the development of the ventricular myocardial trabeculae

As mentioned above, although development of the heart of conventional animal models has been studied in great depth, there is no detailed information on this process in chondrichthyans. Specifically, the early development of the ventricular myocardium, also known as trabeculation, has been studied in

representative species with compact myocardium such as birds and mammals (Icardo & Fernández-Terán, 1987; Sedmera et al., 1997; Sedmera, 2000; Icardo et al., 2011) or with trabeculated myocardium like zebrafish (Hu et al., 2000; Liu et al., 2010; Peshkovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014). In all these models, myocardial development can be divided into three stages: emergence, trabeculation and remodeling. However, the differences found between trabeculation in zebrafish and tetrapod species make the study of this process in other animal models of special interest. In zebrafish, an organism with a trabeculated ventricle, the emergence consists of delamination of the cardiomyocytes of the monostratified myocardium in the early ventricular wall. The cardiomyocytes become grouped forming small myocardial projections oriented towards the lumen. These projections grow during the trabeculation stage by means of oriented cell divisions. Finally, the ventricular myocardium acquires the adult anatomy after the remodeling stage (Liu et al., 2010; Peshkovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014). This process differs from that described in birds and mammals. In the case of tetrapods, the emergence is not due to the delamination of the cardiomyocytes, but rather to the invasion of the myocardium, which unlike zebrafish is formed by more than two cellular layers, by endocardial cells. In the initially compact myocardium, intramyocardial spaces are formed, which are invaded and lined by endocardial cells. During the trabeculation stage these upholstered spaces give rise to the intertrabecular spaces, which grow during remodeling to form the trabeculae (Sedmera et al., 2000; Icardo et al., 2011). After remodeling, the trabeculated myocardium undergoes a compaction process, in which the continuous layer of ventricular cardiomyocytes proliferates without forming trabeculae (Samsa et al., 2013). So far, it was unknown whether the development of the ventricular myocardium observed in zebrafish represents the primitive condition.

To test this hypothesis, we have studied the beginning of the development of the mixed-type ventricular myocardium in the chondrichthyan *S. canicula* and compared with the development described for other groups of vertebrates. The results show that the development of the myocardial trabeculae of the cardiac ventricle of *S. canicula* follows the three phases described in other models such as chicken or mouse.

The first phase or emergence occurs during the developmental stage 28. Histological results from semi-thin sections show that the heart wall at this stage is made up of three layers: epicardium, myocardium and endocardium. The monolayered endocardium and the two-three layered myocardium are separated by an acellular space called cardiac jelly. In successive stages of development, small intramyocardial spaces, revealed by transmission electron microscopy, appear between the cardiomyocytes. Within the cardiomyocytes, numerous vesicles are formed near the cell membrane, which suggests that the development of these spaces is a consequence of the secretion of extracellular material into the matrix. Concomitantly to the formation of these spaces, the cardiac jelly begins to reduce its thickness. This causes focal contacts between endocardial cells and the developing myocardium. Subsequently, endocardial cells invade the myocardium, breaking through between the already formed intramyocardial spaces. This invasion creates recesses on the surface of the ventricular myocardium that connect the intramyocardial spaces with the ventricular lumen.

The results obtained from semi-thin sections and immunohistochemistry show that during trabeculation, the myocardium gets thicker due to the increase in size of the intramyocardial spaces. These spaces become cavities, as [Muñoz-Chápuli et al. \(1994\)](#) previously observed. The growth of the cavities causes the appearance of two myocardial layers, one external continuous and one internal and discontinuous, connected by a set of myocardial fascicles with radial arrangement. These fascicles, also called crests, have been observed during the development of the ventricular myocardium in other groups of vertebrates (reptiles, birds and mammals), but always with a dorsoventral orientation. It is currently debated whether these dorsoventral ridges are involved in the ventricular septation process ([Jensen et al., 2012](#)).

The process ends with the myocardial remodeling. During this development phase, the inner myocardial trabeculated layer is reorganized, acquiring the appearance observed in adult specimens. Later, especially after hatching, the outermost myocardial layer proliferates, increasing its thickness. This gives rise to the compact layer of the ventricular myocardium. Additionally, the results with the anti-MyHC A4.1025 antibody (anti-fast MyHC) during cardiac

development show that the distribution of isomyosins described in chapter IV is acquired at stage 34. This suggests that just before hatching, the heart of *S. canicula* undergoes an isoform change or switch, which redistributes the fast isomyosins (MYH2 and MYH6) in the inflow and the slow ones (MYH7 and MYH7B), not reactive to A4.1025, in the cardiac outflow hemodynamic region.

These phases of trabeculation of the ventricular myocardium, as well as their developmental mechanisms, coincide with those described in two animal models with compact ventricular myocardium, namely chicken and mice ([Icardo and Fernández-Terán, 1987](#); [Kruithof et al., 2013](#)). The similarity in the number of cell layers, between two and three, that make up the developing ventricular myocardium of the three species stands out. Other similarities are also observed, such as the process of focal contact of endocardial cells, which has been described as a touchdown in the mouse ([Del Monte-Nieto et al., 2018](#)). However, this process clearly diverges from that described in the model with mostly trabeculated myocardium, the zebrafish, in which emergence occurs as an active invagination of cardiomyocytes towards the lumen ([Liu et al., 2010](#); [Peshovsky et al., 2011](#); [Staudt et al., 2014](#)). Therefore, these results suggest that the trabeculated myocardium is formed by a mechanism that diverges from that in tetrapods and chondrichthyans. Therefore, even though the zebrafish is a widely extended animal model ([Bakkers, 2011](#); [Beffagna, 2019](#); [Giardoglou and Beis, 2019](#)), the divergence between this species and other vertebrate models in relation to the development of ventricular myoarchitecture reveals certain limitations for its use in the study of human cardiac myopathies.

Recently, molecular similarities in the trabeculation processes between zebrafish and mice have been detected, what could be presented as evidence of a common morphogenetic mechanism. Specifically, the Notch1 pathway regulates the interaction between endocardial and myocardial cells, and the Nrg/ErbB2/ErbB4 pathway facilitates the oriented cell division of cardiomyocytes during trabeculation in both animal models ([D'Amato et al., 2015](#); [Samsa et al., 2015](#); [Uribe et al., 2018](#); [Fukuda et al., 2019](#)). However, the temporal and spatial patterns of activation of these signaling pathways differ significantly between the two models. In the mouse, Notch1 is active in the endocardium during early emergence and is restricted to the base of the trabeculae, while in zebrafish, it is

not active during the period of trabeculation ([Samsa et al., 2015](#)). On the other hand, the Nrg/ErbB2/ErbB4 pathway is active at the tip of the growing trabeculae in mice and at the base of the trabeculae in the case of zebrafish.

This PhD thesis was supported by fellowship FPU15/03209 (Formación de Profesorado Universitario; Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Madrid, Spain), and grants CGL2014-52356-P and CGL2017-85090-P (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Madrid, Spain), FEDER funds, research group BIO-203 (Estudios Cardiovasculares en Vertebrados, Junta de Andalucía, Spain) and Plan Propio de Investigación (Universidad de Málaga, Spain).

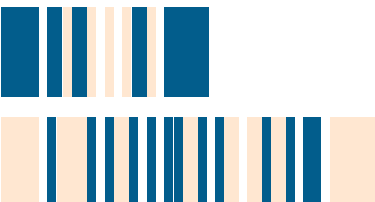
The sample processing and results obtention has taken place in the laboratories of the Department of Animal Biology of the Faculty of Sciences, and in the Molecular Biology, Microscopy and Proteomics Services (SCAI) from the University of Malaga. We thank the Spanish Institute of Oceanography (MEDITS and MAURIT campaigns) and Mr. Sebastián Martín (Caleta de Vélez, Málaga) for their contribution in obtaining the material.

Keywords: Evolution; Gnathostomes; Chondrichthyans; Heart; Myocardium; Myosin Heavy Chain.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Prefacio





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Formato de la tesis

El formato de la presente tesis se ajusta al de “tesis por compendio de publicaciones” regulado en el Artículo 21 en el “Reglamento de Doctorado de la Universidad de Málaga”. En dicho reglamento se indica:

1. Podrán presentarse para su evaluación como tesis doctoral un conjunto de trabajos publicados por el doctorando directamente relacionados sobre el tema de la tesis doctoral.

2. Las tesis presentadas como compendio de publicaciones deberán constar de una introducción en la que se presenten los trabajos y se justifique la unidad temática de los mismos para conformar una tesis, un resumen global de los resultados, la discusión de estos resultados –si procede-, las conclusiones y una copia de los trabajos que forman parte integrante de la tesis. La introducción debe ser lo suficientemente extensa y debe incluir el estudio del estado de la cuestión, preliminares y aquellos detalles que no se han podido incluir en las publicaciones que avalan la tesis por limitaciones de espacio.

3. Para la presentación de tesis por compendio de publicaciones será necesario que esté compuesta por un mínimo de tres publicaciones (artículos, capítulos de libro o libros). Dichas publicaciones son las que se tendrán en cuenta para avalar la tesis.

4. La suma de las puntuaciones de las publicaciones que forman parte de una tesis presentada como compendio de publicaciones ha de ser igual o superior a 1 punto, según los criterios utilizados por la ANECA o los elaborados por las diferentes comisiones académicas de doctorado, siempre en cumplimiento con los criterios de la ANECA.

Aval y estructura de la tesis

La presente memoria de tesis está constituida por una compilación de cuatro artículos publicados y firmados por el doctorando como primer o segundo autor, que se presentan a continuación como capítulos. Todos los artículos aquí

agrupados están indexados según los criterios del *Journal Citation Reports* (JCR, Science Edition, Clarivate) de su año de publicación. De las cuatro publicaciones, la primera, [Durán et al., J. Anat. \(2015\), 226: 501-510](#), se encuentra dentro de la categoría de “Anatomy & Morphology” (T1, 4/21), la segunda [López-Unzu et al., Front. Zool. \(2019\), 16 \(1\): 1-15](#) en “Zoology” (T1, 15/168), la tercera [López-Unzu et al., J. Fish Biol. \(2020\), 97 \(3\): 734–739](#) en “Marine & Freshwater Biology” (T2, 50/106) y la cuarta, [López-Unzu et al., Sci. Rep. \(2020\), 10 \(1\): 14434](#) en “Multidisciplinary Sciences” (T1, 17/71). Por lo tanto, atendiendo a los criterios de Programa de Doctorado en Diversidad y Medio Ambiente de la Universidad de Málaga, la puntuación total de estas publicaciones asciende a 3,75.

Para cumplir con la normativa vigente en la Universidad de Málaga, esta memoria incluye una introducción general que justifica la unidad temática de la tesis, un capítulo enumerando los objetivos generales de la tesis, un resumen de cada uno de los artículos que se compendian en esta memoria, una discusión general, una lista con las conclusiones obtenidas de la tesis, un original de cada uno de los artículos compendiados y una lista bibliográfica con las referencias utilizadas en el texto.

Ámbito de ejecución de la Tesis

La presente tesis, “Organización, vascularización y desarrollo del miocardio en Condrictios”, se ha realizado en el marco del Programa de Doctorado en Diversidad y Medio Ambiente de la Universidad de Málaga. El doctorando ha estado vinculado al Grupo de Estudios Cardiovasculares en Vertebrados (Referencia: BIO203 del PAIDI, Junta de Andalucía), con sede en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, entre los años 2015 y 2021. Parte del material de estudio procede de campañas MEDITS y MAURIT del Instituto Español de Oceanografía, con el cual el citado Grupo BIO203 viene manteniendo una dilatada colaboración. El procesamiento de las muestras y la obtención de resultados ha tenido lugar en los laboratorios del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias y en los Servicios de Biología Molecular, Microscopía y Proteómica de

los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

El doctorando se incorporó al grupo de investigación en el año 2011, justo cuando estaba en vigor el proyecto CGL2010-16417. En ese momento se inició una investigación sobre la mioarquitectura y vascularización del miocardio ventricular de diferentes especies de holocéfalos. Toda esta investigación queda plasmada en el artículo [Durán et al. \(2015\)](#), que constituye el punto de inicio de la presente tesis, el aval necesario para la consecución del contrato predoctoral FPU que financia al doctorando y la base de los dos proyectos de investigación vigentes durante el periodo de tesis, MIOCOR (CGL2014-52356-P) y ORICOR (CGL2017-85090-P). Durante este tiempo, el doctorando se ha propuesto aunar la tradición morfológica y embriológica del grupo con nuevas técnicas derivadas de su formación en Biología Celular y Molecular. Esto ha permitido profundizar en el estudio del proteoma y el desarrollo del corazón de los condrictios, enfocando la evolución cardiaca desde una perspectiva novedosa. Los resultados parciales obtenidos se han presentado en diferentes ámbitos de divulgación científica. Fruto de estos años de estudio son los últimos tres artículos de la memoria, [López-Unzu et al. \(2019\)](#), [López-Unzu et al. \(2020a\)](#) y [López-Unzu et al. \(2020b\)](#).

Financiación de la tesis

La presente tesis está adscrita a los proyectos de investigación MIOCOR (CGL2014-52356-P) y ORICOR (CGL2017-85090-P) financiados por el antiguo Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, ahora Ministerio de Innovación y Ciencia (Madrid, España), y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).

El doctorado se ha beneficiado de un contrato predoctoral de “Formación de Profesorado Universitario (FPU)” (FPU15/03209) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Madrid, España).

Las participaciones a Congresos Internacionales donde se han ido presentando resultados parciales de la presente tesis han sido financiadas por

el Plan Propio de Investigación de la Universidad de Málaga, los proyectos de Investigación antes mencionados, el grupo de investigación “Estudios Cardiovasculares en Vertebrados” (Referencia: BIO203, Junta de Andalucía), y el Campus de Excelencia Internacional del Mar (CeI-Mar).

El doctorando ha realizado dos estancias internacionales financiadas, de tres meses cada una, durante el periodo predoctoral. La primera, en la Université Pierre et Marie Curie-Sorbonne Universités-Paris VI (París, Francia), fue financiada por las “Ayudas a la obtención del título de Doctorado Internacional” de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Málaga (Convocatoria 2017). La segunda, en la Sorbonne Université, Faculté des Sciences et Ingénierie (París, Francia) en el grupo “Paléohistologie, paléobiologie et évolution des vertébrés”, fue financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (EST17/00194).



Consideraciones éticas

Este proyecto cumple con los principios éticos de la Directiva de la UE 2010/63: Minimizar el daño y maximizar el beneficio y el bienestar animal, en particular asegurando la reposición, reducción y refinamiento (3R) en la investigación animal y el respeto y la protección del medio ambiente y las generaciones futuras. La Directiva de la UE 2010/63 hace referencia explícita al "Principio de las 3R" y requiere que "los Estados miembros contribuyan mediante la investigación y por otros medios al desarrollo y validación de enfoques alternativos". El doctorando y los directores de la tesis comparten y suscriben la Directiva de la UE. El principio de las 3R se aplicó estrictamente a la

metodología del proyecto con el fin de proporcionar un marco para planificar y evaluar el diseño de experimentos que asegurase el bienestar animal óptimo.

Difusión y comunicación de los resultados de la tesis

Los resultados de la presente tesis se han difundido mediante cuatro publicaciones en revistas indexadas (JCR) y cinco comunicaciones a congresos nacionales e internacionales de diferente temática.

Artículos:

López-Unzu MA, Durán AC, Rodríguez C, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2020b. Development of the ventricular myocardial trabeculae in *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes): Evolutionary implications. *Scientific Reports* 10 (1): 14434. Rank: Q1 (17/71).

López-Unzu MA, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC. 2020a. Myosin heavy chain isoforms in the myocardium of the atrioventricular junction of *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Carcharhiniformes). *Journal of Fish Biology* 97 (3): 734–739. Rank: Q2 (24/53).

López-Unzu MA, Durán AC, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2019. Differential expression of myosin heavy chain isoforms in cardiac segments of gnathostome vertebrates and its evolutionary implications. *Frontiers in Zoology* 16 (1): 1-15. Rank: D1 (15/168).

Durán AC, López-Unzu MA, Rodríguez C, Fernández B, Lorenzale M, Linares A, Salmerón F, Sans-Coma V. 2015. Structure and vascularization of the ventricular myocardium in Holocephali: their evolutionary significance. *Journal of Anatomy* 226 (6): 501-510. Rank: Q1 (4/21).

Comunicaciones:

López-Unzu MA, Soto-Navarrete MT, Fernández MC, Rodríguez C, Fernández B, Durán AC. Los elasmobranquios como modelo para la

trabeculación del miocardio ventricular. XV Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Sevilla (06-08/11/2019). *Libro de Resúmenes*, 149.

López-Unzu MA, Rodríguez C, Soto-Navarrete MT., Fernández B, Durán AC. Ventricular Myocardial Trabeculation in Chondrichthyans. Evolutionary Implications. International Congress of Vertebrate Morphology (ICVM12). Prague, Czech Republic (21-25/07/2019). *Anatomical Record* 280, S1, S168.

López-Unzu MA, Durán AC, Soto-Navarrete MT, Fernández B. Chamber specific expression of Myosin heavy chain 7B in the heart of vertebrates. Experimental Biology 2018. San Diego, CA, USA (21-25/04/2018). *FASEB Journal*, 32(Supl.1): 518.1.

López-Unzu MA. Chamber specific expression of Myosin heavy chain 7B in the heart discriminates different groups of vertebrates. Journée scientifique 'Jeunes Systématiciens' at Muséum National d'Historie Naturelle (Paris, Francia). 12/10/2018.

López-Unzu MA, Rodríguez C, Lorenzale M, Fernández B, Durán AC. Myocardial trabeculation in embryos of *Scyliorhinus canicula* (Elasmobranchii, Chondrichthyans). Experimental Biology 2018. San Diego, CA, USA (21-25/04/2018). *FASEB Journal*, 32(Supl.1): 518.9.

López-Unzu MA, Lorenzale M, Soto-Navarrete MT, Durán AC, Sans-Coma V, Fernández B. The Myosin Heavy Chain specific A4.1025 antibody discriminates different cardiac segments in ancient groups of gnathostomes: Morphological and evolutionary implications. International Congress of Vertebrate Morphology (ICVM11). Washington, DC, USA (29/06-03/07/2016). *Anatomical Record*. 299, pp. 264-264.

Durán AC, López-Unzu MA, Rodríguez C, Lorenzale M, Fernández B, Sans-Coma V. Myocardial structure and vascularization of the heart ventricle in holocephali: implications for heart evolution. International Congress of Vertebrate Morphology (ICVM10). Barcelona, Spain (08-12/07/2013). *Anatomical Record*. 296, pp. 277-278.

Difusión de resultados en un ámbito no especializado:

López-Unzu MA, Oreja-Fuentes P, Arrebola-Mesa DM, Soto-Navarrete MT.

Evolución del latido. Una historia sobre tiburones, corazones y algunas miosinas. IV Jornadas de investigadores en formación fomentando la interdisciplinariedad. Granada (España). 26/06/2019.

López-Unzu MA, Galindo LJ. Charla en el 'Liceé Spagnol Luis Buñuel', Neuilly-Sur-Seine (Francia). 15/11/2018.

López-Unzu MA. Conferencia en el 'Colegio de España, Cité Universitarie de Paris', Paris (Francia). 12/11/2018.

López-Unzu MA. Conferencia en el 'Colegio de España, Cité Universitarie de Paris', Paris (Francia). 20/11/2017.

López-Unzu MA, Lorenzale M, Soto-Navarrete MT. ¿De dónde vienes, corazón? ¿Existe un origen evolutivo del miocardio compacto y su vascularización común para todos los Vertebrados? II Jornadas de investigadores en formación fomentando la interdisciplinariedad. Granada (España). 19/05/2017

Lorenzale M, López-Unzu MA, Soto-Navarrete MT. Conferencia en el "CEIP Rectora Adelaida de la Calle", Málaga (España). 25/04/2016.

López-Unzu MA, Lorenzale M, Soto MT. ¿Qué hay de pez en tu corazón? Los puntos clave de la evolución cardíaca. Congreso 'Desganando Ciencia 3'. Granada (España). 15-17/04/2016.

Otras publicaciones relacionadas con la tesis

Adicionalmente a estos, hasta la fecha de depósito de esta memoria, se han obtenido diferentes resultados complementarios relacionados con el proyecto de tesis, pero no incluidos en el compendio de publicaciones por diferentes motivos.

Artículos:

Soto-Navarrete MT, López-Unzu MA, Durán AC, Fernández B. 2020. Embryonic development of bicuspid aortic valves. *Progresses in Cardiovascular Disease* 63: 407-418. Rank: Q1 (15/138).

Fernández B, Soto-Navarrete MT, López-García A, López-Unzu MA, Durán AC, Fernández MC. 2020. Bicuspid Aortic Valve in 2 Model Species and Review of the Literature. *Veterinary Pathology* 57 (2): 321-331. Rank: Q1 (28/142).

Lorenzale M, Fernández B, Durán AC, López-Unzu MA, Sans-Coma V. 2019. The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes): Anatomical, histological, and evolutionary aspects. *Anatomia Histologia Embryologia* 48 (1): 40-45. Rank: Q3 (96/142).

Lorenzale M, López-Unzu MA, Rodríguez C, Fernández B, Durán AC, Sans-Coma V. 2018. The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians. *Biological Reviews* 93 (3): 1604-1619. Rank: D1 (2/87).

Soto-Navarrete MT, Arqué JM, Durán AC, Fernández MC, López-Unzu MA, Lorenzale M, Sans-Coma V, Fernández B. 2018. The arrangement of the coronary artery trunks is subject to inheritance factors: A study in Syrian hamsters. *Anatomia Histologia Embryologia* 47 (2): 140-144. Rank: Q3 (94/141).

Rodríguez C, Lorenzale M, López-Unzu MA, Fernández B, Salmerón F, Sans-Coma V, Durán AC. 2017. The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance. *Zoology* 123: 37-45. Rank: Q1 (36/167).

Lorenzale M, López-Unzu MA, Fernández MC, Durán AC, Fernández B, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V. 2017. Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes). *Zoology* 120: 15-23. Rank: Q1 (36/167).

Sans-Coma V, Rodríguez C, López-Unzu MA, Lorenzale M, Fernández B, Vida L, Durán AC. 2017. Dicephalous v. diprosopus sharks: record of a two-headed embryo of *Galeus atlanticus* and review of the literature. *Journal of Fish Biology* 90 (1): 283-293. Rank: Q2 (19/51).

López-García A, Soto-Navarrete MT, Fernández MC, Moncayo-Arlandi J, Durán AC, López-Unzu MA, Alonso-Briales JH, Fernández B. 2016. Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice. Are they strain-specific? *Journal of Anatomy* 229 (5): 703-709. Rank: Q1 (3/21).

Comunicaciones:

Fernández MC, Soto-Navarrete MT, López-Unzu MA, Pozo-Vilumbrales B, Durán AC, Fernández B. Origen elevado de las arterias coronarias en roedores y posible implicación del gen *Smad2*. XV Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Sevilla (06-08/11/2019). *Libro de resúmenes*, 148.

Soto-Navarrete MT, Fernández MC, López-Unzu MA, Durán AC, Fernández B. Fusion of conotruncal ridges during cardiac outflow tract septation relays on an endocardial-mesenchymal transition process. Cardiovascular development meeting 2019. European Society of Cardiology Working Group on Development, Anatomy and Pathology. Málaga, Spain (14-15/10/2019). *Libro de resúmenes*, 74.

Soto-Navarrete MT, López-Unzu MA, Pozo-Vilumbrales B, Durán AC, Fernández B. Coronary Artery High Take-off in Rodents, and the Possible Involvement of *Smad2*. International Congress of Vertebrate Morphology (ICVM12). Prague, Czech Republic (21-25/07/2019). *Anatomical Record* 280, S1, S222.

López-Unzu MA, Durán AC, Fernández B, Sans-Coma V, Cubo J. HSP90 Inhibition Causes Heterochronies in the Skull Ossification Sequences of *Pleurodeles waltl* (Urodela). Evolutionary Implications. International Congress of Vertebrate Morphology (ICVM12). Prague, Czech Republic (21-25/07/2019). *Anatomical Record* 280, S1, S167.

López-Unzu MA, Fernández B, Fernández MC, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Durán AC. Herencia del origen anormalmente alto de una arteria coronaria (high take-off) en un modelo animal. Sociedad Española de Cardiología 2016. Zaragoza, Spain (27-29/10/2016). *R. Española de Cardiología* 69(Supl.1): 1148.

Moncayo-Arlandi J, Fernández MC, Soto-Navarrete MT, López-Unzu MA, Fernández B, Durán AC. Effect of hyperlipidic diets on normal and abnormal aortic valves in the Syrian hamster: A preliminary study. XIII Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Cáceres, Spain (18-20/11/2015). *Laboratory Animals*, 49-S3.

Durán AC, Rodríguez C, Lorenzale M, Linares A, López-Unzu MA, Sans-Coma V. The bulbus arteriosus of the holocephalan heart. International congress in Vertebrate morphology (ICVM10). Barcelona, Spain (08-12/07/2013). *Anatomical Record*. 296, pp. 277-277.

Agradecimientos

Nada surge de la nada. Durante estos años he tenido el placer de aprender, conversar y discutir con diferentes personas que han ayudado a que este proyecto llegue a buen puerto. Quiero que sirvan las siguientes líneas para condensar el agradecimiento y admiración que profeso por cada una de ellas.

A la Profesora Ana Carmen Durán Boyero, directora de la presente tesis doctoral. Desde hace una década ha mostrado una paciencia admirable enseñándome no solo a fijarme en cada pequeño detalle que me rodea, sino en cómo ser mejor, tanto para mí como para los demás. De ella me llevo los consejos y la confianza de una gran profesora, directora y amiga. Gracias por cada uno de estos años, han sido los mejores.

Al Profesor Borja Fernández Corujo, director de la presente tesis doctoral. Su confianza en mí ha propulsado mi carrera, me ha hecho crecer y eso significa más de lo que pueda expresar en este párrafo. De él he aprendido que la honestidad y la sinceridad en la ciencia y en la vida es más importante que cualquier artículo. De él me llevo cada reunión en su despacho, en la que me ha empujado a no ser conformista y me ha dado lecciones que prometo no olvidar. Gracias por hacer este camino tan llevadero como divertido.

Al Profesor Valentín Sans Coma. Él ha sido y siempre será mi profesor. Lo poco que consiga en la ciencia tiene su origen en la confianza que depositó en mí el día que ingresé en el Grupo. Si he querido este camino ha sido por sus clases, si he consagrado estos años a este tema de investigación ha sido por sus charlas y si disfruto con la docencia ha sido por su ejemplo. Gracias por estar a mi lado cuando más lo he necesitado.

Al Profesor Luis Javier Palomo Muñoz, quien ha ejercido como Director del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga durante los años de realización de esta tesis. Le agradezco su compañía en no pocos momentos y su paciencia soportando mi versión más reivindicativa en el Consejo de Departamento.

Al Profesor José María Pérez Pomares, Director del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga. Él me ha marcado el límite que

superar, el mínimo exigible. Compartir con él docencia y debates sobre diversos temas no solo me ha permitido tener una perspectiva diferente de la investigación, sino que también me ha ayudado a construir una visión crítica del mundo que me rodea.

Al Profesor Ramón Muñoz-Chápuli Oriol. Pocas veces un doctorando puede compartir Departamento con uno de los investigadores a los que más admira en su campo. La influencia de su trabajo queda patente en cada página de esta memoria. De él me llevo su buen hacer, así como su capacidad de comunicar y entusiasmar.

A la Profesora María Eugenia Majón-Cabeza Clouté. A ella le agradezco su generosidad al darme oportunidades para crecer y formarme, así como la confianza depositada en mi a lo largo de estos años. Gracias por cada uno de tus consejos.

A la Profesora Victoria de Andrés Fernández, por apoyar mi candidatura al contrato predoctoral que ha soportado esta tesis de forma totalmente altruista. Gracias por cada palabra de ánimo durante este viaje.

Al Profesor José Enrique García Raso, la Profesora Carmen Salas Casanova y el Profesor Serge Gofas. A ellos les agradezco su supervisión y su paciencia durante mi paso por cada una de sus asignaturas. De ellos me llevo la responsabilidad que conlleva ejercer la docencia.

A la Dra. Rita Carmona Mejías. De ella he aprendido a nunca tirar la toalla y a ser incansable en mis objetivos. Gracias por motivarme a ser mejor, a ir más lejos y por ayudarme a enfocar mi vida profesional. A mis compañeras de “abajo”, Dra. Ana Cañete, Dra. Laura Ariza, Sandra Díaz y Silvia Barrera. Sabéis de sobra que convivir con vosotras estos años ha sido un regalo. No creo que encuentre mejor compañía para parar a comer y, por supuesto, para trabajar.

Al Profesor Raimundo Real Giménez, al Profesor Jesús Olivero Anarte y la Dra. Ana Luz Márquez Moya, el Dr. Miguel Ángel Farfán Aguilar, el Dr. Antonio Román Gallego, el Dr. David Romero Pacheco, la Dra. Lucrecia Souvirón Priego y el Dr. Francisco Díaz Ruiz. Por tantos momentos de

convivencia, docencia e, incluso, burocracia conjunta. Me han transmitido su amor por la naturaleza, me han dado una visión diferente de la Zoología y de todo aquello que sucede fuera de un laboratorio.

No me quiero olvidar de mis compañeros Darío Chamorro, Chema Carrasco, Adrián Martín y Alisa Aliaga. En cada conversación, clase o reivindicación me he dado cuenta de la enorme suerte que he tenido al coincidir con vosotros. Gracias por enseñarme tanto.

Al Profesor Juan Antonio Guadix Domínguez, el Dr. Adrián Ruiz Villalba, el Dr. Paul Palmquist Gomes, así como el resto de mis compañeros en Bionand, Mari Castillo, Sara Cano, Cristina Pogontke, Clàudia Oliveira y Ernesto Marín. Por ser una referencia científica, recordarme cuál es el nivel científico al que debo aspirar, por inspirarme y por haberme ayudado en momentos críticos. Gracias por enseñarme tanto.

Al Dr. David Navas, por su eterna paciencia configurando los microscopios y soportando mis llamadas para descargar cada foto. A Remedios Crespillo, por su amabilidad, paciencia y guía en cada una de mis incursiones en la Biología Molecular. Al Dr. Casimiro Cárdenas, la Dra. Mercedes Martín y el Profesor Javier Márquez, por brindarme la posibilidad de realizar todos los experimentos necesarios para esta tesis en la Unidad de Proteómica del SCAI y darme esa valiosa discusión sobre los resultados obtenidos.

A Luis Vida, José Zamora, Inmaculada Ruiz y Juan Antonio Rando por toda la ayuda que han brindado en esta tesis.

Al Profesor Jorge Cubo García. Fue una conferencia suya durante el Grado en Biología la que disparó mi interés por la evolución biológica, por lo que es fácil entender que uno de los grandes sueños que he cumplido durante este periodo ha sido tener la posibilidad de trabajar junto a él. Le agradezco su enorme generosidad al recibirme dos veces en su laboratorio, tratarme como uno más y empujarme fuera de mi zona de confort para mejorar, tanto profesional y como personalmente.

Extiendo este agradecimiento a la Profesora Eva Moreno, Profesor Néstor Herrán, Dra. Raquel Sánchez, Profesor René Zaragüeta, Profesor

Santiago Aragón, y Mathieu Faure-Brac por cada comida, conversación y debate durante mis estancias en la Universidad de la Sorbona. Hicisteis que me sintiera como en casa. A la Profesora Louise Zylberberg y Hayat Lamrous, por acompañarme, enseñarme y ayudarme durante mi estancia en el laboratorio.

A todos los buenos profesores y profesoras, así como a mis compañeros y compañeras que me han acompañado en clase (en el colegio, grado o máster) durante estos años, en especial a Adrián Pintado, Ángela Machuca, Antonella Sturla, Alejandro López, Alejandro Tamayo, Sebastián Martín, Tomás Santiago, Malu Fernández, Mariri Vicioso, Lucia Campos, Sito Torres, Miguel Lorenzale, Andrea Linares e Ismael Reyes. Todos fuisteis y sois responsables directos de lo que soy.

A mis jefes, el Dr. Alejandro López, la Dra. Cristina Rodríguez y la Dra. Agustina Torres, de los que aprendí mucho de lo que he aplicado en esta tesis. A la Dra. M^a Carmen Domínguez, Mamen, por tu compañía durante estos años, tus consejos y transmitirme tu cariño por los animales.

A mis compañeras Bárbara Pozo y Laura Martín. Gracias por soportarme cada día, confiar en mí, enseñarme no pocas cosas y, sobre todo, por estar a mi lado tantas horas cada día. Tenéis el cielo ganado.

A cada uno de los alumnos TFG y TFM que han pasado por el laboratorio, en especial a Desirée Martín, Pilar Oreja y Violeta Llorente.

A mi amiga María Teresa Soto, Mari Tere. Gracias por tu generosidad a lo largo de estos años, por tantas aventuras, por soportarme tantas horas y enseñarme a ser mejor dentro y fuera del laboratorio. Ha sido y es un placer compartir todos estos años de investigación contigo.

Y si bien es cierto que he estado rodeado de magníficos profesionales que me han inspirado durante la realización de esta tesis, también he estado acompañado de una familia y amigos sin los que no habría tenido las fuerzas para concluir este proyecto.

A lo largo de este periodo predoctoral he tenido la inmensa suerte de conocer e incluso, convivir con personas fantásticas. Paris fue no solo una

oportunidad científica, sino también personal, al descubrir a un grupo de personas con las que viví un sinnúmero de experiencias que han marcado esta tesis. Quiero agradecer, a cada una de ellas, la posibilidad de compartir esos meses con ellos como una pequeña familia. A Javi, Núria y Miguel, por cada una de nuestras escapadas durante esa estancia de 2017. A Juanan, mi co-biólogo malagueño en París. A Ismael, mi compañero de conciertos. A Alba y a Silvia, mi nexos entre las dos estancias y a Luis y a Jorge, por todos nuestros debates sobre evolución. A todos, gracias.

También he tenido la fortuna de estar rodeado de amigas y amigos tan generosos como para comprender los sacrificios, ausencias y cambios de humor que provoca esta etapa. Gracias por cada consejo, concierto, festival, viaje, visita... Veros orgullosos de esto ha sido el mayor aliciente para afrontarlo. Por ello y mucho más, gracias, Alfonso, Alicia, Álvaro, Antonio, Babu, Cazorla, Carlos, Diego, Lucía, Miguel, Pablo, Paloma, Rocío, Santi y Zenaida.

No quiero olvidarme de quienes han estado y se han preocupado por mí desde antes de empezar esta aventura: Inma, Javi, Carlos, Blanca, Christian, Pilar, Alejandro, Álvaro, Víctor, Dani y Pedro entre otros tantos. A Julia (@yuu.yuuri), por compartir su arte en esta tesis sin pedir nada a cambio.

A Maite Sáez, José Miguel Lasasa, Nacho Lasasa y Cristina Aznárez, por vuestra generosidad incondicional y por arroparme como uno más de la familia. A la familia Sáez y la familia Lasasa, por abrirme la puerta de vuestras casas y reuniones con tanto cariño. A Lola, por ser una fuente inagotable de alegría.

A mis tías, Carmen, Gloria y María del Mar, a mis tíos Cósimo, Pepillo y Manolo, a mis primos Yoyita, Cósimo y Rodrigo. Por cuidarme desde siempre, por preocuparos por mí y por seguirme de cerca. Vuestro apoyo y comprensión ha sido una fuente de alegría durante todos estos años.

A mi tía Ana, por que, aun yéndote demasiado pronto, has estado presente durante todo este camino. A mis tías Belén y Begoña, mis tíos, Kiko, Antonio e Ignacio y mis primos, Martín, David, María, Víctor, Teresa, Pablo,

Daniel y Elena. Porque aun siendo el raro me habéis acompañado y porque, aunque estemos lejos, siempre os he sentido cerca.

A mis tíos Paco, Fermín e Ignacio, que forjasteis parte de mi personalidad con vuestro sentido del humor y vuestros debates mientras estaba puesto de fondo Informe Semanal. A mis tías Carmen, Chon, Mariflor, Pilar, María Jesús, Tere, Fernanda y toda esa gran familia que me ha arropado desde niño. A Blanqui, por tu cariño.

A mi abuela, Matilde, por servir de mediadora del cariño de mis abuelos Tomás y Blas y mi abuela, Gloria. Gracias por servir de nexo con todo lo bueno que significa la familia, por cuidarme y por darme lecciones que me han acompañado en este y otros proyectos. Eres un regalo.

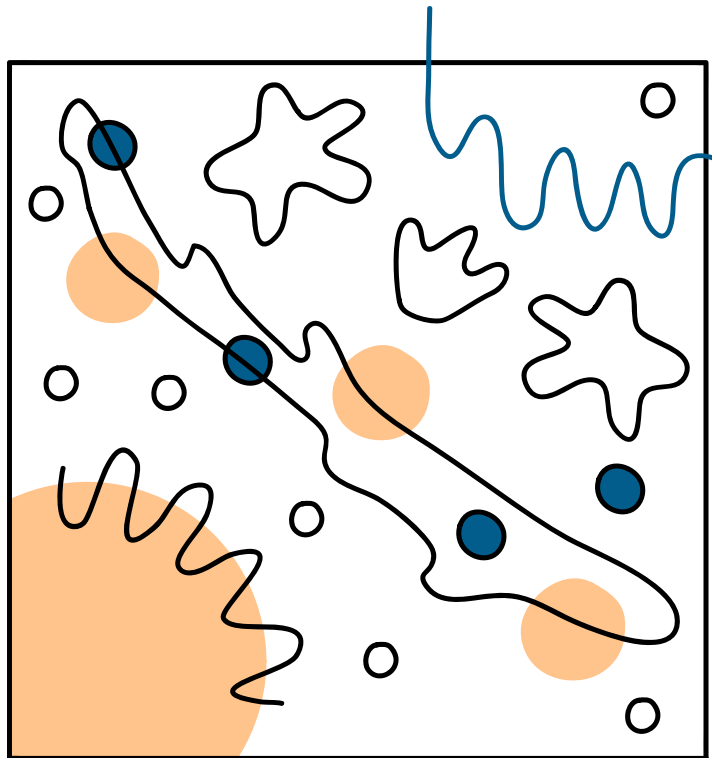
A ti, Álvaro, por ser el mayor orgullo de este hermano mayor que a veces ha estado un poco ausente durante estos años. Gracias por tu confianza y comprensión.

A mis padres, Rocío y Miguel, por ser los mejores ejemplos y la mayor suerte que he tenido en esta vida. Ellos, con su esfuerzo, me dieron la mejor educación, me siguieron de cerca y me apoyaron cada una de mis decisiones. Gracias por soportar mis caras largas, por preguntarme cómo iba todo y por darme la seguridad necesaria para llevar a cabo todo esto.

Y finalmente, a ti, Maite. Porque si son mías estas palabras, tuyos son cada uno de los espacios. Gracias por convertir cada subida y bajada de este viaje en algo que compartir juntos. Gracias por ser mi mejor amiga, compañera y confidente. Lo sabes, todo esto, también es tuyo. Te quiero.

Capítulo I

Introducción





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El sistema circulatorio de los vertebrados

El sistema circulatorio es el conjunto de órganos dedicados al transporte de gases y nutrientes por todos los tejidos y órganos del animal a través de un líquido circulante, la sangre. En todos los vertebrados está constituido por un conjunto de vasos por donde fluye la sangre y un órgano central que la bombea, el corazón.

Los vasos sanguíneos se clasifican en arterias y venas según el sentido de su circulación. Si la sangre parte desde el corazón y transita hacia los órganos, los vasos por donde circula se denominan arterias. Por lo contrario, si la sangre parte desde los órganos y fluye hacia al corazón, circula por las venas. Tanto arterias como venas presentan una disposición jerárquica atendiendo a su diámetro y los componentes histológicos de su pared. Los grandes vasos, arterias y venas, se ramifican respectivamente en arteriolas y vénulas que son elementos de menor calibre que irrigan a todos los órganos y tejidos. Tanto el sistema arterial como el venoso confluyen en una red capilar, un conjunto de vasos que presentan un calibre mínimo y una pared formada únicamente por endotelio. Es en esta red capilar donde se realiza el intercambio de gases y nutrientes a nivel celular.

Atendiendo al número de veces que circule la sangre a través del corazón cada vez que se completa el circuito, podemos identificar dos tipos de sistemas circulatorios en vertebrados: los sencillos y los dobles (Figura 1). Los sistemas circulatorios sencillos son los más extendidos dentro de los vertebrados. Están presentes en todos los agnatos y la mayoría de los gnatostomados. Estos sistemas circulatorios se caracterizan por una circulación única de la sangre a través del corazón cada vez que se completa el circuito. La sangre es bombeada inicialmente desde el corazón hacia los órganos respiratorios, antes de irrigar el resto de los órganos y tejidos del animal. Una vez irrigados, la sangre es reconducida de nuevo hacia el corazón por un sistema de retorno formado por venas. Por su parte, los sistemas circulatorios dobles son una novedad evolutiva compartida por la mayoría de los sarcopterigios, es decir, constituyen una sinapomorfía de este grupo. En este tipo de sistemas, la sangre debe circular dos veces a través del corazón para que se completen dos circuitos. Cada

circuito es un sistema de arterias, venas y capilares que se conectan a través del corazón. Uno de los circuitos está relacionado con los órganos, generalmente pulmones, donde se realiza el intercambio gaseoso. El otro es el circuito general o sistémico, que transporta la sangre a todos los órganos del animal. El corazón bombea la sangre en ambos circuitos, permitiendo que el oxígeno captado en el circuito respiratorio sea transportado mediante el circuito sistémico. Al igual que en los sistemas sencillos, el retorno venoso al corazón se produce a través de un conjunto de vénulas y venas.

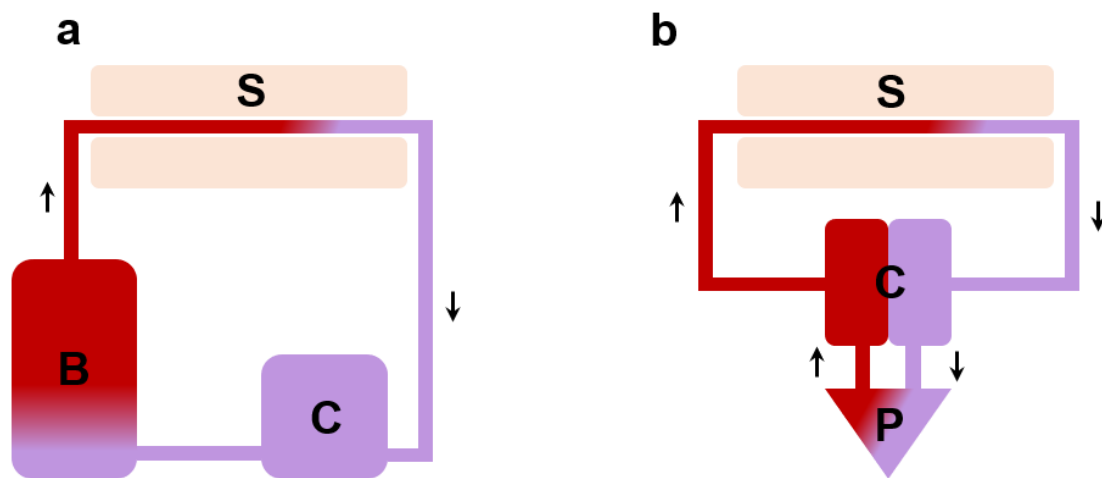


Figura 1. Esquemas de un ejemplo de sistema circulatorio sencillo (a) y uno doble (b). Mientras en el sistema circulatorio sencillo la sangre pasa solo una vez por el corazón cada vez que se completa el circuito, en el sistema circulatorio doble la sangre pasa dos veces por el corazón. B, Branquias; C, corazón; P, pulmones; S, circuito sistémico.

El corazón de los vertebrados

Anatomía del corazón

El corazón es un órgano musculoso que colecta y bombea la sangre en todos los tipos de sistemas circulatorios de los vertebrados. A nivel anatómico el corazón se sitúa usualmente en posición medio-ventral en el animal y se encuentra rodeado por el pericardio, una serosa que encierra la cavidad pericárdica (Cerra et al., 2003). En el corazón se distinguen varios componentes o segmentos. Estos difieren en su histomorfología y aparecen en diferente número y disposición en los distintos grupos de vertebrados. Los segmentos

cardiacos poseen una pared que encierra un espacio interno o lumen por donde circula la sangre (Pérez-Pomares et al., 2009). Entre los diferentes segmentos cardiacos hay complejos valvulares formados por un número variable de válvulas. Las válvulas, a excepción de las atrioventriculares y las sinoatriales, están constituidas por un elemento fijo, el seno, y un elemento móvil, la valva. En todos los casos, las válvulas se abren y cierran de forma sincrónica y acorde a la contracción del corazón permitiendo un flujo unidireccional de la sangre. En otras palabras, los complejos valvulares evitan el reflujo de sangre en los sistemas circulatorios.

Pese a la elevada diversidad morfológica de los diferentes segmentos cardiacos, estos pueden ser agrupados atendiendo a un criterio funcional en dos polos o regiones hemodinámicas: la región o polo de entrada y la región o polo de salida. Mientras la región cardiaca de entrada incorpora los segmentos que reciben la sangre desde las venas, la de salida agrupa los segmentos que eyectan la sangre por las arterias principales (Simoes-Costa et al., 2005). Atendiendo a la disposición de los segmentos cardiacos en ambas regiones o polos se pueden identificar dos grandes tipos de diseños anatómicos cardiacos en vertebrados: los corazones no tabicados y los tabicados.

Corazones no tabicados

Los corazones no tabicados, también conocidos como corazones bicamerales, están presentes en todos los grupos de gnatostomados excepto en los tetrápodos y dipnoos adultos (Simoes-Costa et al., 2005). Estos tipos de corazón solo están presentes en sistemas circulatorios sencillos.

Tal como indican las descripciones más actualizadas (Grimes y Kirby, 2009; Icardo y Colvee 2011; Lorenzale et al., 2018a), un corazón no tabicado está formado por seis segmentos cardiacos, dispuestos en serie y en forma de “S” (Figura 2). Los segmentos son el seno venoso, el atrio, la región atrioventricular, el ventrículo, el cono arterioso y el bulbo arterioso. El cono y el bulbo arterioso constituyen conjuntamente el tracto de salida cardiaco (Grimes y Kirby, 2009).

La sangre que retorna por las venas hepática y de Cuvier la recibe el seno venoso. El seno se conecta anteriormente con el siguiente segmento, el atrio, entre los cuales existe el complejo valvular sinoatrial (Santer y Cobb, 1972; Ramos et al., 1996). Aun siendo plenamente contráctiles ambos segmentos, el aporte a la función cardiaca del atrio es mayor, al ser su contracción más rápida y tener un menor tiempo de recuperación, por lo que es el principal elemento de la región de entrada (Aho et al., 1999). Este segmento se comunica ventralmente con el ventrículo mediante un segmento intermedio, la región o unión atrioventricular, que sustenta un complejo valvular.

El ventrículo y el tracto de salida constituyen el denominado polo o región de salida del corazón. El ventrículo es el principal segmento contráctil del corazón al ser el que más aporta a la función cardiaca (Santer y Cobb, 1972). En posición anterior a este segmento, se encuentra el tracto de salida cardiaco, formado por dos componentes, el cono arterioso y el bulbo arterioso. La longitud relativa de estos con respecto a la longitud total del tracto de salida es variable entre diferentes grupos (Rodríguez et al., 2017). Actualmente se acepta que se ha producido una reducción sistemática del cono arterioso a lo largo de la filogenia de los gnatostomados (Maldanis et al., 2016).

El cono arterioso es un segmento miocárdico, proximal con respecto al ventrículo, que sustenta las denominadas válvulas conales. El número de estas válvulas difiere entre grupos, habiéndose reducido significativamente en acipenseriformes, amiiformes y teleósteos (Maldanis et al., 2016). Se ha atribuido tres funciones principales al cono arterioso: (1) dado que la contracción de este segmento es de tipo peristalticoide se cree que actúa como “cámara de bombeo accesoria” al ventrículo (Sudak, 1965), (2) debido a la disposición del miocardio conal se ha propuesto que este segmento puede funcionar también como un reservorio elástico, que ayuda a minimizar las fluctuaciones en la presión sanguínea (Keith, 1924; Daniel, 1934), (3) por último, mediante pruebas experimentales *in vivo* se ha demostrado que la musculatura del cono capacita los complejos valvulares permitiendo su buen funcionamiento (Satchell y Jones, 1967).

El bulbo arterioso es el elemento más distal del tracto de salida cardiaco y el único segmento del corazón que no presenta miocardio en su pared. Este segmento cumple funciones de reservorio elástico, de forma que permite mantener el flujo sanguíneo de forma constante y protege a los vasos de los arcos branquiales de los cambios de presión arterial (Lorenzale et al., 2017). El bulbo arterioso se encuentra en continuidad con la aorta ventral, que llevará la sangre a los órganos respiratorios, las branquias.

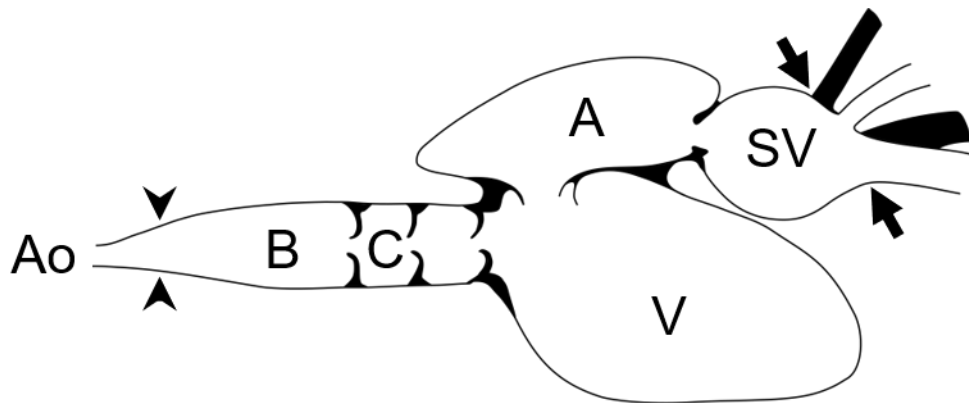


Figura 2. Esquema del corazón de un condrictio (Adaptado de Ahnode; CC BY 3.0). A, atrio; Ao, aorta ventral B, bulbo arterioso; C, cono arterioso; SV, seno venoso; V, ventrículo; Puntas de flecha, límite anterior del pericardio; Flechas, límite posterior del pericardio.

Corazones tabicados

Los corazones tabicados engloban a los corazones tricamerales y tetracamerales. Este diseño cardiaco es una sinapomorfía de sarcopterigios y se caracteriza por presentar dos atrios, cada uno conectado con un circuito diferente en un sistema circulatorio doble (Simoes-Costa et al., 2005). Este diseño se modifica en distintos grupos de vertebrados según el número de segmentos que los constituyan y el grado de septación que presente su polo de salida, debido a que existen corazones con dos ventrículos totalmente separados o con un ventrículo parcialmente tabicado.

Los anfibios tienen un corazón en el que se distinguen dos atrios (región de entrada) y un solo ventrículo conectado con un cono arterioso (región de salida), de donde parten las arterias sistémicas y las pulmo-cutáneas (Jensen et al., 2014). Por otro lado, en la mayoría de los reptiles actuales, existen dos atrios

(región de entrada) y dos ventrículos parcialmente tabicados (región de salida) de donde parten directamente las arterias sistémicas y la pulmonar (Romenskii, 1978). Dentro de los reptiles actuales, los cocodrilos son una excepción, ya que los ventrículos se encuentran separados, aunque existe una pequeña comunicación denominada foramen de Panizza en la base de los troncos sistémicos (Romenskii, 1978). En ambos grupos, anfibios y reptiles, existe un seno venoso en la región de entrada, que recibe la sangre de las venas cavas y, mediante un flujo pasivo, la sangre pasa hacia el atrio derecho (Tabla 1) (Romenskii, 1978).

Solo las aves y los mamíferos poseen corazones completamente tabicados en cámaras, derechas e izquierda, con dos atrios en la región de entrada y dos ventrículos en la región de salida. La aorta y la arteria pulmonar conectan con los ventrículos izquierdo y derecho, respectivamente, mientras que las venas pulmonares y las cavas drenan, a su vez, en sus correspondientes atrios, izquierdo y derecho (Tabla 1).

El flujo de la sangre ocurre de forma similar en todos los tetrápodos, al tratarse en todos los casos de un sistema circulatorio doble. La sangre llega desde el circuito sistémico a través de las venas cavas a la región cardiaca de entrada derecha, constituida por el seno venoso y/o el atrio derecho. Desde el atrio derecho, la sangre es eyectada al ventrículo común en el caso de los anfibios y la mayoría de los reptiles, o al ventrículo derecho en cocodrilos, aves y mamíferos. El ventrículo derecho propulsa la sangre a la arteria pulmonar, conectada con el circuito respiratorio. El sistema respiratorio puede estar constituido por pulmones y, en el caso de los anfibios, también por sistemas adicionales de intercambio gaseoso (p.ej. intercambio cutáneo, oral, branquias). La sangre oxigenada regresa desde los órganos respiratorios por las venas pulmonares hacia la región cardiaca de entrada izquierda, compuesta únicamente por el atrio izquierdo, que llevará la sangre al ventrículo común en anfibios y algunos reptiles o al ventrículo izquierdo en cocodrilos, aves y mamíferos. Finalmente, la sangre es bombeada por este ventrículo (único o izquierdo) a través del cono arterioso (anfibios) o directamente a las arterias sistémicas (reptiles) o aorta (aves y mamíferos) hacia todos los tejidos del animal.

	Pisciformes	Anfibios	Reptiles	Aves	Mamíferos
Corazón no tabicado	Adultos	Embriones	Embriones	Embriones	Embriones
Corazón tabicado	-	Adultos	Adultos	Adultos	Adultos
Miocardio ventricular trabeculado	Adultos	Adultos	Adultos	Embriones	Embriones
AV miocárdico	Adultos	Adultos	Adultos	Embriones	Embriones
Septación atrial parcial	Dipnoos	Adultos	Embriones	Embriones	Embriones
Septación atrial total	-	Anuros	Adultos	Adultos	Adultos
Septación ventricular parcial	-	-	Adultos	Embriones	Embriones
Septación ventricular total	-	-	-	Adultos	Adultos

Tabla 1. Principales diferencias anatómicas entre los corazones de los diversos grupos de vertebrados. El grupo de los pisciformes hace referencia a un grupo parafilético formado por condictios y osteíctios no tetrápodos. Tabla adaptada de [Jensen et al. \(2013\)](#).

El grado de tabicación cardiaca. Polaridad del carácter.

Evolutivamente, los sistemas circulatorios dobles y los corazones tabicados presentes en estos sistemas representan un nuevo carácter dentro de los vertebrados. Esta hipótesis se sustenta en dos tipos de evidencia, las filogenéticas y las embriológicas.

El análisis de la distribución de los corazones de tipo tabicado y los sistemas circulatorios dobles en la filogenia de vertebrados indica que solo están presentes en los tetrápodos y dipnoos. Por este motivo ambos caracteres pueden ser considerados como una novedad de estos grupos ([Simoes-Costa et al., 2005](#)). De forma adicional, en las etapas iniciales del desarrollo cardiaco de diferentes especies de tetrápodos se observa que la disposición del corazón embrionario se asemeja a la de un corazón no tabicado (revisado por [England y Loughna, 2018](#)). En conjunto, estas evidencias sugieren que el diseño cardiaco primitivo en los vertebrados debe ser similar a un corazón de tipo no tabicado como el observado en condictios ([Lorenzale et al., 2018a](#)). Por su parte, el

diseño derivado en los gnatostomados corresponde al corazón de tipo tabicado de los sarcopterigios.

Histomorfología de los segmentos cardiacos

La pared de los segmentos de los corazones, tabicados o no, está compuesta por tres capas: el endocardio, una capa intermedia y el epicardio. El endocardio está compuesto un epitelio monoestratificado que tapiza el lumen cardiaco. Su parte externa contacta con un tejido conjuntivo denominado subendocardio, que se encuentra entre el endocardio y la capa media de la pared. El miocardio es, generalmente, la capa media de la pared cardiaca excepto en segmentos como el bulbo arterioso. Cuando está presente, es la capa de mayor grosor de las tres, excepto en el seno venoso. Se compone de fibras de una musculatura estriada especializada que son responsables de la función contráctil del corazón. Finalmente, el epicardio es la capa exterior de la pared de todos los segmentos cardiacos. Se trata de un epitelio monoestratificado que limita exteriormente con el espacio pericárdico e interiormente con un tejido conjuntivo denominado subepicardio, que se sitúa entre epitelio y la capa media de la pared (Pérez-Pomares et al., 2009).

De las tres capas que forman la pared cardiaca, el miocardio es la capa más variable a nivel histomorfológico. Clásicamente se han descrito tres tipos principales de mioarquitecturas denominadas trabeculada, compacta y mixta. El miocardio trabeculado o esponjoso se caracteriza por la existencia de una capa constituida por trabéculas y profundos recesos o espacios intertrabeculares, tapizados por el endocardio. El tipo compacto está compuesto por una capa de fibras miocárdicas condensadas, sin ningún componente trabeculado. Finalmente, el tipo mixto consta de dos capas, una exterior de tipo compacto y otra, interior, de tipo trabeculado. La proporción entre ambas capas difiere entre los distintos grupos de vertebrados (Tota et al., 1983; Santer, 1985; Tota, 1989; Davie y Farrell, 1991; Agnisola y Tota, 1994; Grimes y Kirby, 2009; Farrell et al., 2012).

Atendiendo a esta clasificación el miocardio del seno venoso y del atrio son de tipo trabeculado. Es cierto que ambos presentan diferencias notables, ya que el miocardio sinusal está formado por un conjunto de haces dispersos en la pared cardiaca mientras que el miocardio atrial (musculatura pectínea) se distribuye formando cordones o trabéculas (Santer, 1985; Icardo et al., 2005).

Interpuesta entre las regiones cardiacas de entrada y salida se encuentra la unión atrioventricular cuya pared, en los corazones no tabicados, posee un miocardio compacto, profusamente irrigado por arterias coronarias, que se encuentra en continuidad con los miocardios atrial y el ventricular, es decir, con los miocardios del polo de entrada y de salida (Icardo y Colvee, 2011).

El miocardio de la región cardiaca de salida, es decir, del ventrículo y el cono arterioso, presenta una histomorfología más variable, sobre todo en el ventrículo. Atendiendo a Tota et al. (1983), según la proporción de la capa compacta del miocardio ventricular y su vascularización coronaria se puede clasificar la mioarquitectura ventricular de los vertebrados pisciformes en cuatro tipos (I-IV) con una complejidad morfológica creciente (Tabla 2). Al no encontrarse miocardios puramente compactos en pisciformes, esta clasificación solo incorpora miocardios de tipo trabeculado y mixto.

El tipo I se caracteriza por presentar un miocardio ventricular meramente trabeculado. Dentro de este tipo se han descrito, como mínimo, tres subtipos atendiendo a la vascularización del miocardio. Se denomina tipo Ia a los miocardios avasculares, Ib a los miocardios con arterias coronarias que recorren el epicardio y Ic a los miocardios irrigados con arterias coronarias que llegan al subepicardio (Grimes y Kirby, 2009). Los tipos II, III y IV son miocardios de tipo mixto. El tipo II se caracteriza por una irrigación coronaria restringida a la capa de miocardio compacto, mientras que los tipos III y IV también presentan arterias coronarias en la capa trabeculada. La distinción entre los tipos III y IV radica en la proporción que representa el miocardio compacto en el total de la pared cardiaca: si es menor del 30% es de tipo III y si es mayor del 30% es de tipo IV (Tota et al., 1983; Grimes y Kirby, 2009).

Existe actualmente un debate sobre cuál de estas mioarquitecturas constituye la condición primitiva en los gnatostomados. Clásicamente se ha supuesto que el miocardio ventricular de tipo trabeculado, irrigado por sangre luminal (subtipo Ia), es el más primitivo (MacKinnon y Heatwole, 1981; Farmer, 1997, 1999). Esta hipótesis se sustenta en dos tipos de evidencia, las filogenéticas y las embriológicas. Por un lado, a nivel filogenético cabe señalar que los agnatos, grupo hermano de los vertebrados gnatostomados, poseen un ventrículo trabeculado y avascular (Yamauchi, 1980). Por otro lado, durante el desarrollo cardíaco, la trabeculación ocurre antes de la formación del miocardio compacto (Sedmera et al., 2000; Sedmera y Ostadal, 2012). Un escenario evolutivo alternativo es el propuesto por Farrell et al. (2012), en el cual, aunque la condición primitiva en los vertebrados fuese la mioarquitectura ventricular trabeculada y avascular, en los gnatostomados debería ser el miocardio de tipo mixto.

	Tipo de miocardio ventricular					
	Ia	Ib	Ic	II	III	IV
Mioarquitectura	Trabeculada	Trabeculada	Trabeculada	Mixta	Mixta (Compacto <30%)	Mixta (Compacto >30%)
Vascularización coronaria	Ausente	Epicardio	Subepicardio	Compacta	Compacta y esponjosa	Compacta y esponjosa

Tabla 2: Clasificación de las mioarquitecturas ventriculares descritas en vertebrados pisciformes según Tota et al. (1989). En estos grupos de vertebrados no se observan miocardios ventriculares puramente compactos, por lo que solo se recogen mioarquitecturas de tipo trabeculada o mixta.

El cono arterioso es el segmento inmediatamente contiguo al ventrículo y se caracteriza por tener un miocardio compacto (Grimes et al., 2006).

El único segmento no miocárdico del corazón es el bulbo arterioso, el elemento más distal del tracto de salida. Su delgada pared presenta una histomorfología similar a la de una arteria, ya que posee musculatura lisa, colágeno y elastina (Moriyama et al., 2016). El bulbo arterioso se diferencia de la aorta ventral en la disposición de las capas de la pared, porque se encuentra



en el interior de la cavidad pericárdica y porque presenta un desarrollo embrionario diferente (Icardo et al., 2004; Durán et al., 2008).

El sistema de conducción

La contracción de los segmentos cardiacos ocurre de forma secuencial en todos los tipos de corazones descritos en vertebrados. El mecanismo responsable de esta sincronización en la contracción es variable y no siempre bien conocido en los diferentes grupos de vertebrados.

En el caso de aves y mamíferos, los únicos taxones con metabolismo endotermo, la contracción de su miocardio está mediada por un sistema de conducción cardiaco. De forma resumida, este sistema de transmisión de impulsos eléctricos está constituido por diferentes elementos morfológicos. Inicialmente la señal eléctrica se genera en el marcapasos, el nodo sinoatrial, un conjunto de miocardiocitos especializados en generar la señal eléctrica que se propaga por todo el atrio causando la activación y contracción de este (Christoffels et al., 2010). En estos corazones, los miocardios de la región de entrada (atrios) y de salida (ventrículos) están histológica y eléctricamente aislados por un tejido conjuntivo situado en la región atrioventricular, lo que evita que esta señal pase de segmento a segmento de forma desincronizada (Aanhaanen et al., 2010). La comunicación eléctrica entre ambas regiones se establece a través del nodo atrioventricular. La disposición anatómica de las fibras miocárdicas atriales permite conducir el impulso hasta el nodo atrioventricular, desde donde se transmite al haz de His. Este haz de miocardiocitos especializados se ramifica por todo el ventrículo, ralentizando y atenuando la señal proveniente del atrio, lo que permite la activación y contracción de todo el miocardio de forma secuencial (Christoffels et al., 2010). Este tipo de sistema de conducción permite que aves y mamíferos tengan alto ritmo de contracción y, gracias a ello, un gran flujo de oxígeno a todos los sistemas orgánicos. Este hecho favorece claramente los metabolismos más activos propios de los animales endotermos (Burggren et al., 2010).

En el resto de gnatostomados, como condrictios y actinopterigios, pese a tener también una contracción cardiaca de tipo secuencial, no se ha descrito un sistema de conducción a nivel morfológico, es decir, un sistema constituido por todos los elementos anatómicos mencionados en el párrafo anterior ([Jensen et al., 2012](#)). Al igual que otros gnatostomados ectotermos como los anfibios o los reptiles actuales, los condrictios y los actinopterigios presentan un conjunto de “componentes primordiales” relacionados con el sistema de conducción ([Jensen et al., 2012](#)). En concreto, en el seno venoso de los condrictios y los teleosteos se ha descrito un plexo formado por células, similares a las neuronas postsinápticas, que interaccionan con el miocardio adyacente, permitiendo un control autónomo de la función cardiaca a modo de “marcapasos putativo” ([Yamauchi et al., 1980](#); [Santer, 1985](#); [Ramos et al., 1996](#); [Stoyek et al., 2015](#)).

Sin embargo, a diferencia de aves y mamíferos, los corazones no tabicados de condrictios, actinopterigios y otros tetrápodos ectotermos presentan una unión atrioventricular constituida por miocardio, no por un tejido de tipo fibroso ([Wessels et al., 1996](#); [Aanhaanen et al., 2010](#)). Este miocardio atrioventricular se caracteriza por estar en continuidad histológica con el miocardio atrial y ventricular ([Icardo y Colvee, 2011](#)). Actualmente, no queda claro cuál es el rol del miocardio atrioventricular en la sincronización de la contracción cardiaca para que esta ocurra de forma secuencial. A este respecto se ha propuesto que el miocardio atrioventricular presenta un fenotipo molecular (Bmp2/4-Tbx2/3 positivo y Gja5/Nppa negativo) que puede permitirle mantener cierto aislamiento eléctrico ([Jensen et al., 2012](#)).

La contracción cardiaca

La contracción cardiaca es un movimiento involuntario y cíclico que se da en el miocardio de todos los vertebrados. Este movimiento se produce a consecuencia del acortamiento de unas unidades de contracción denominadas sarcómeros. Estos están formados por diferentes proteínas, entre las que destacan la actina y la miosina. La actina es una proteína estructural que forma fibras conectadas con el resto del citoesqueleto. Las miosinas son proteínas motoras responsables del movimiento que dará lugar al acortamiento del sarcómero. No todas las

miosinas desempeñan las mismas funciones motoras. En concreto, dentro de esta superfamilia de proteínas, las encargadas de efectuar la contracción de los miocardiocitos son las miosinas sarcoméricas, un subgrupo de miosinas convencionales (Clase II) que se pueden encontrar también en la musculatura esquelética (Figura 3) (Sellers, 2000). El acortamiento de los sarcómeros que causa la contracción de los miocardiocitos implica un gasto energético en forma de ATP. Al hidrolizar el ATP, las miosinas cambian de conformación estructural, causando un movimiento sincrónico que provoca la retracción de las fibras de actina y, con ello, la contracción de las miofibrillas. Posteriormente, sin un gasto accesorio de ATP, la miosina recupera la conformación inicial provocando en última instancia que el sarcómero deje de contraerse (Risal et al., 2004).

Estructuralmente, las miosinas sarcoméricas son globulinas compuestas por seis péptidos: dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras (Figura 3) (Sellers, 2000). Las cadenas ligeras de miosina presentan un tamaño molecular y una estructura variable. Su función en el complejo consiste en estabilizar e iniciar la actividad contráctil de las miosinas sarcoméricas, ya que se precisan de su fosforilación mediada por una quinasa dependiente de troponina-tropomiosina para la activación de la proteína (Farah y Reinach, 1995). Las cadenas ligeras se clasifican en tres tipos diferentes: las cadenas esenciales (20 kDa), las cadenas reguladoras (25 kDa) y las cadenas de 15 kDa (Picard et al., 2011).

Las cadenas pesadas de miosina (MyHC) son los péptidos de mayor tamaño dentro del heterohexámero, llegando a tener un peso molecular de hasta 244 kDa. Su estructura está constituida por una cabeza globular y una cola. La cabeza globular, que se encuentra en el extremo N-terminal, conecta mediante la región de cuello con una larga cola. La cabeza es la porción motora, realiza funciones ATPásicas e interacciona con las fibras de actina. La región de la cola se entrelaza de forma helicoidal (estructura en α -hélice) con otra MyHC, formando dímeros funcionales (Sellers, 2000). Cuando se realiza la hidrólisis del ATP en las cabezas globulares, éstas cambian de conformación arrastrando las fibras de actina con las que interaccionan. A este proceso se lo conoce como el ciclo del puente cruzado o “*cross bridge cycle*” (Rayment, 1993).

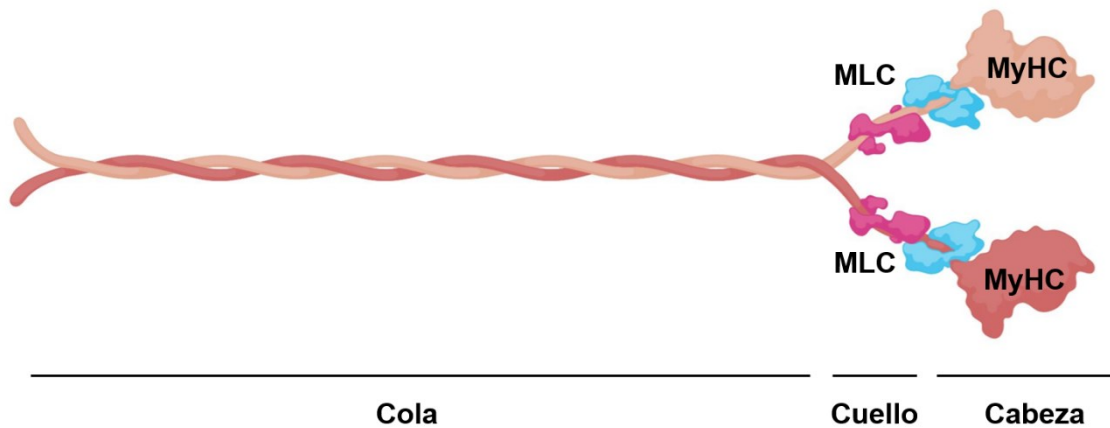


Figura 3. Esquema de un hexámero de miosina sarcomérica (Adaptado de BioRender). La proteína está formada por dos cadenas pesadas (MyHC) y cuatro ligeras (MLC). Estructuralmente se divide en tres regiones denominadas: cabeza, cuello y cola. La cabeza, situada en el extremo N-terminal de la MyHC incorpora la función ATPásica de la proteína y cambia de conformación durante el ciclo del puente cruzado.

Se ha descrito un total 13 isoformas sarcoméricas de MyHC o isomiosinas (Tabla 3). La nomenclatura de estas isoformas atiende a la forma descrita por el acuerdo HGNC (*Human genome organization Gene Nomenclature Committee*). Siguiendo esta nomenclatura las isomiosinas se nombran de forma abreviada como MYH y el número de identificación de la isoforma. Hasta la fecha en mamíferos se han descrito en el miocardio cuatro isoformas de MyHC: MYH3, MYH6, MYH7 y MYH7B (England y Loughna, 2013). Estas isoformas presentan diferencias en la velocidad de contracción (V_{max}) y en su actividad contráctil (Nikitina et al., 2015). A este respecto, se ha descrito casi el doble de actividad y cuatro veces más V_{max} en MYH6 que en MYH7. Por otro lado, la fuerza de contracción de MYH7 es mayor que la de MYH6 (Alpert et al., 2002). Son estas diferencias las que posibilitan la clasificación en isoformas de MyHC de contracción rápida (*fast-twitch* o *fast-fiber myosins*), como MYH6, o lenta (*slow-twitch* o *slow-fiber myosins*), como MYH7 y MYH7B. Debido a la colocalización de diferentes isomiosinas en las mismas fibras musculares y la dificultad para separarlas, no se dispone hoy en día de una información comparada sobre la actividad motora de todas las isoformas.

	Abreviatura HGNC	Musculatura	Tipo	Artículo de referencia
Myosin heavy chain 1 (MyHC-IIx/d)	MYH1	Esquelética	Rápida	Lee et al. (2019)
Myosin heavy chain 2 (MyHC-IIa)	MYH2	Esquelética	Rápida	Lee et al. (2019)
Myosin heavy chain 3 (MyHC-Embryonic)	MYH3	Embrionaria	Rápida	Schiaffino et al. (2015)
Myosin heavy chain 4 (MyHC-IIb)	MYH4	Esquelética y fetal	Muy rápida	Lee et al. (2019)
Myosin heavy chain 6 (Cardiac Muscle Alpha)	MYH6	Miocárdica	Rápida	England y Loughna (2013)
Myosin heavy chain 7 (Cardiac Muscle Beta)	MYH7	Miocárdica y esquelética	Lenta	England y Loughna (2013)
Myosin heavy chain 7B (MyHC-14)	MYH7B (MYH14)	Extraocular y embrionaria	Lenta	Rossi et al. (2010)
Myosin heavy chain 8 (MyHC-Perinatal)	MYH8	Embrionaria	-	Schiaffino et al. (2015)
Myosin heavy chain 9 (Cellular MyHC Type A)	MYH9	No muscular	-	Pecci et al. (2019)
Myosin heavy chain 10 (Cellular MyHC Type B)	MYH10	No muscular	-	Ridge et al. (2017)
Myosin heavy chain 11 (Smooth Muscle Isoform)	MYH11	Lisa y esquelética no diferenciada	-	Babu et al. (2000)
Myosin heavy chain 13 (Skeletal, Extraocular)	MYH13	Extraocular	Muy rápida	Briggs y Schachat (2002)
Myosin heavy chain 15	MYH15	Extraocular	Lenta	Desjardins et al. (2002)
Myosin heavy chain 16 (MyHC-5)	MYH16 o MYH5	Temporal y masetero	Lenta	Rossi et al. (2010)

Tabla 3. Clasificación actual de isoformas de cadena pesada de miosina atendiendo a la abreviatura HGNC. Solo se muestran las isoformas de MyHC convencionales (Clase II), tanto musculares como no musculares, que están organizadas como heterohexámeros. Adicionalmente, se muestra su nombre formal, abreviatura, localización tisular (musculatura) y tipo de contracción.

Los estudios en mamíferos muestran que las diferentes isomiosinas presentan una distribución heterogénea en el miocardio. Existen isoformas de MyHC que solo se encuentran en fases temporales concretas, como MYH3 y MYH7B que se expresan únicamente durante el desarrollo cardiaco o MYH6 y MYH7, que también se localizan en los miocardios adultos. Se han detectado isoformas que tienen un patrón de distribución espacial concreto, como MYH6

(α -MyHC) que es más abundante en los miocardios de la región de entrada o MYH7 (β -MyHC) que está más localizada en la región de salida (England y Loughna, 2013; Schiaffino et al., 2015).

Se ha definido el termino miosinoma como el conjunto de isomiosinas que se hayan en un tejido particular (Domingues et al., 2020). Actualmente se conoce que esta distribución heterogénea de isoformas de MyHC no es un rasgo exclusivo de mamíferos (Figura 4). Esto es debido a que se han detectado una mayor concentración de transcritos de ortólogos del gen *myh6* humano, es decir, de isomiosinas cardíacas de contracción rápida, en las regiones de entrada de teleósteos (aMyHC), anfibios (aMyHC) y aves (aMyHC). De la misma forma se ha observado que los ortólogos de la miosina cardíaca de contracción lenta *myh7* humana son también más abundantes en la región de salida de teleósteos (vMyHC) y aves (vMyHC) (Bisaha y Bader, 1991; Moore et al., 1992; Yuztey et al., 1994; Reiser y Klinner, 1998; Yelon et al., 1999; Morkin, 2000; Berdougo et al., 2003; Garriock et al., 2005; Somi et al., 2006; Mascarello et al., 2009; England y Loughna, 2013). El corazón de los anfibios representa una excepción a este patrón MYH6/MYH7 al expresar otra isoforma lenta (MYH15) como isomiosina principal del ventrículo cardíaco (Garriock et al., 2005). Por lo tanto, en todos los tipos de corazón de vertebrados estudiados hasta la fecha, la región de entrada cardíaca presenta una alta concentración de isomiosinas de contracción rápida, mientras que la región de salida está enriquecida en isoformas de MyHC de contracción lenta (England y Loughna, 2013). Actualmente no se tiene la certeza de si este patrón es común a todos los corazones de gnatostomados, al desconocerse la distribución de isoformas de MyHC en otros grupos como condriictios, sarcopterigios no tetrápodos (p.ej. dipnoos) o algunos actinopterigios no teleósteos (p.ej. bichires o lepisosteiformes).

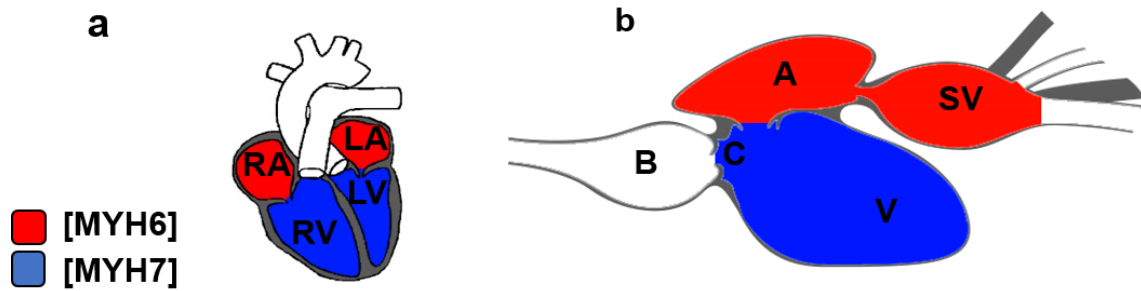


Figura 4. Esquemas anatómicos de los corazones de un mamífero (a) y de un teleósteo (b) (Adaptados de Ahnede; CC BY 3.0). En los esquemas se muestran los segmentos cardíacos donde se ha identificado una mayor concentración de isoformas MYH6 (rojo) o MYH7 (azul) atendiendo a la revisión de [England y Loughna \(2013\)](#). A, atrio; B, bulbo arterioso; C, cono arterioso; LA, atrio izquierdo; LV, ventrículo izquierdo; RA, atrio derecho; RV, ventrículo derecho; SV, seno venoso; V, ventrículo.

El desarrollo embrionario del corazón

Al igual que en otros aspectos referentes al corazón, el conocimiento más exhaustivo de su desarrollo corresponde al estudio de modelos de tetrápodos como el ratón, *Mus musculus*, o el pollo, *Gallus gallus* ([Sedmera, 2000](#); [Icardo y Colvee, 2011](#)). Sin embargo, se conoce también de forma extensa el desarrollo del corazón de tipo no tabicado de los teleósteos, en concreto, del pez cebra, *Danio rerio* ([Hu et al., 2000](#)). Además, existen descripciones del desarrollo de corazones no tabicados en otros grupos en vertebrados, como los acipenseriformes, *Acipenser naccarii* ([Icardo et al., 2009](#)) o los elasmobranquios ([Muñoz-Chápuli et al., 1994](#); [Rodríguez et al., 2013](#)) entre otros.

Los estudios comparativos entre especies con una distancia filogenética tan acusada como el pez cebra y el ratón sugieren que el desarrollo cardíaco comparte unas fases comunes ([England y Loughna, 2018](#)). En todos los casos, el corazón es un órgano de origen mesodérmico proveniente de unos progenitores celulares que migran desde diferentes localizaciones. Esta migración los lleva a confluir en la zona medio-ventral del embrión formando una estructura tubular y contráctil que aumenta en complejidad a lo largo del desarrollo ([Ivanovitch et al., 2007](#)).

Tanto en el ratón como en el pez cebra, el corazón es inicialmente un órgano tubular contráctil y morfológicamente uniforme. Debido a la homogeneidad de la histomorfología en ambos modelos animales, las regiones prospectivas que darán lugar a cada segmento cardíaco solo se pueden discriminar mediante la detección de proteínas específicas como, por ejemplo, isoformas concretas de MyHC (De Groot et al., 1989; De Jong et al., 1990; Lamers et al., 1990; Wessels et al., 1996; Stainier y Fishman, 1992) y otras proteínas responsables de la contracción (Moorman y Lamers, 1994). Entre dichas regiones prospectivas se observan primordios, denominados cojines valvulares, que darán lugar en el adulto a sistemas valvulares propiamente dichos, responsables de regular el flujo sanguíneo (Hu et al., 2000). En estos estadios de desarrollo la pared cardíaca está constituida por una capa miocárdica tapizada interiormente por el endocardio. El miocardio, presente a lo largo de todo el tubo, es una capa monoestratificada, a excepción de la región ventricular donde dicha capa es significativamente más gruesa (Hu et al., 2000). El endocardio y el miocardio no están en contacto directo, sino que entre ambos se interpone una matriz gruesa denominada gelatina cardíaca (Davis, 1924). La capa más externa del corazón, el epicardio, proveniente del mesodermo espláncnico, presenta un desarrollo tardío (Muñoz-Chápuli et al., 2002). En este sentido, cabe señalar que actualmente existe un debate sobre si el mesodermo espláncnico es la única fuente de precursores epicárdicos, ya que estudios recientes han sugerido que células precursoras del epicardio (proepicardio) también pueden tener un aporte del mesodermo somático (Schlueter y Brand, 2013).

En estadios de desarrollo consecutivos se comienzan a definir los diferentes segmentos cardíacos, denominados primigenios en el caso de los tetrápodos (England y Loughna, 2018), mediante constricciones de la pared cardíaca. De forma concomitante al desarrollo de estos segmentos cardíacos primigenios, aparecen las válvulas cardíacas. Concretamente, en el caso de las válvulas del tracto de salida de los condriictios, se forman al excavar los senos en los cojines endocárdicos (Rodríguez et al., 2013). Los aparatos valvulares quedan intercalados en las uniones sinoatrial, atrioventricular y en la porción proximal del tracto de salida (Hu et al., 2000). Finalmente, en la porción distal del

tracto de salida se forma un último segmento, el bulbo arterioso caracterizado por una pared carente de miocardio. El desarrollo del bulbo arterioso no solo ha sido estudiado en teleósteos (Icardo et al., 1999; Hu et al., 2000), sino también en acipenseriformes (Icardo et al., 2009) y elasmobranquios (Rodríguez et al., 2013). Actualmente se debate si este bulbo arterioso es homólogo a otras estructuras intrapericárdicas carentes de miocardio presentes en el polo de salida de los corazones tabicados.

En el caso de los tetrápodos, con un corazón de tipo tabicado, se producen tres procesos adicionales a los descritos en corazones no tabicados durante el desarrollo cardiaco, responsables de la anatomía final del órgano. El primero de ellos, la torsión cardiaca (*loop*). Se trata de un movimiento morfogenético por el cual el corazón tubular sufre un giro que reconfigura la distribución de los polos de entrada y salida situándolos en una posición anterior con respecto a la región ventricular (Taber, 2006). Tras sufrir este cambio topológico, los diferentes segmentos se expanden en un proceso conocido como *balloning*, adquiriendo el número y la morfología observados en el órgano adulto. El último proceso es la tabicación del corazón. Este proceso morfogenético permite separar dos regiones en el corazón, una conectada al circuito respiratorio y otra al sistémico. Esta tabicación, también denominada septación, ocurre a tres niveles: en el tracto de salida, en el atrio y en el primordio ventricular. Su resultado es la separación en dos, tanto del tracto de salida como del atrio y, dependiendo del grupo de tetrápodos, la septación parcial o total del ventrículo (England y Loughna, 2018).

Aparte de la torsión y la septación cardiaca, en el desarrollo del corazón tabicado ocurren otros procesos morfogenéticos diferenciales. Especialmente interesante resultan las diferencias en el desarrollo del miocardio ventricular entre el pez cebra y los tetrápodos. En todos estos modelos, el comienzo del desarrollo del miocardio se puede dividir en tres etapas: emergencia, trabeculación y remodelado. En el pez cebra, un organismo con mioarquitectura ventricular eminentemente trabeculada, la emergencia consiste en una delaminación o extrusión de los miocardiocitos de la región ventricular que forman inicialmente, en el caso de este modelo, un miocardio monoestratificado. Los miocardiocitos se agrupan formando pequeñas proyecciones miocárdicas

orientadas hacia el lumen. Dichas proyecciones crecen durante la etapa de trabeculación mediante divisiones celulares orientadas. Finalmente, el miocardio ventricular adquiere la anatomía adulta tras la etapa de remodelado (Hu et al., 2000; Liu et al., 2010; Peshkovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014). Este proceso dista del descrito en aves y mamíferos. En estos casos, la emergencia no se debe a la delaminación o extrusión de los miocardiocitos sino a la invasión del miocardio por parte de las células endocárdicas, el cual a diferencia del pez cebra, está formado por más de dos capas celulares. En este miocardio, inicialmente compacto, se forman espacios intramiocárdicos, que son invadidos y tapizados por células endocárdicas. Durante la etapa de trabeculación, estos espacios tapizados darán lugar a los espacios intratrabeculares que delimitarán las trabéculas que crecerán durante el remodelado (Icardo y Fernández-Terán, 1987, Sedmera et al., 1997; Sedmera et al., 2000; Icardo y Colvee 2011). Tras el remodelado, en los tetrápodos con una mioarquitectura ventricular compacta, el miocardio trabeculado atraviesa un proceso de compactación, en el que la capa continua de miocardiocitos ventriculares prolifera sin formar trabéculas (Samsa et al., 2013). En la actualidad se desconoce si el desarrollo del miocardio ventricular observado en el pez cebra representa la condición primitiva del carácter.

Posición filogenética de los condriictios

Los vertebrados se dividen en dos grandes grupos: los que carecen de mandíbulas (agnatos) y aquellos que las presentan (gnatostomados). Los gnatostomados se dividen a su vez en dos grupos, los condriictios y los osteíctios. Los condriictios son el taxón formado por elasmobranquios y holocéfalos. Los elasmobranquios incluyen a los selacimorfos (tiburones) y los batoideos (rayas y torpedos) (Naylor et al., 2012). Por su parte, los holocéfalos forman un grupo con características peculiares, que se divide en tres familias: quimeriformes, rinoquimeriformes y calorrínquidos (Inoue et al., 2010). Los osteíctios engloban a los actinoptergios y a los sarcoptergios (Broughton et al., 2013). Las relaciones filogenéticas entre condriictios y osteíctios no han estado exentas de controversia. Clásicamente se ha venido considerando que los condriictios son el

grupo hermano de los osteíctios (Carroll, 1988; Venkatesh et al., 1999; Zardoya, 2001).

La posición filogenética de los condriictios ha estado sometida a discusión en los últimos años. Rasmussen et al. (1999a, 1999b) basándose en estudios de filogenia molecular, han propuesto que los condriictios son un taxón derivado de los osteíctios. Esta nueva hipótesis filogenética implicaría que muchas de las condiciones asumidas como primitivas dentro de los gnatostomados deberían ser consideradas como derivadas. Sin embargo, dicha hipótesis ha sido rechazada en varios trabajos independientes usando las mismas técnicas de análisis filogenético (Meyer y Zardoya, 2003; Takeaki et al., 2003; Blair y Hedges, 2005; Broughton et al., 2013). Por lo tanto, existe un amplio consenso en asumir que los condriictios son el taxón de gnatostomados más antiguo, que divergió del antecesor común de los osteíctios al inicio del Silúrico (Figura 5).

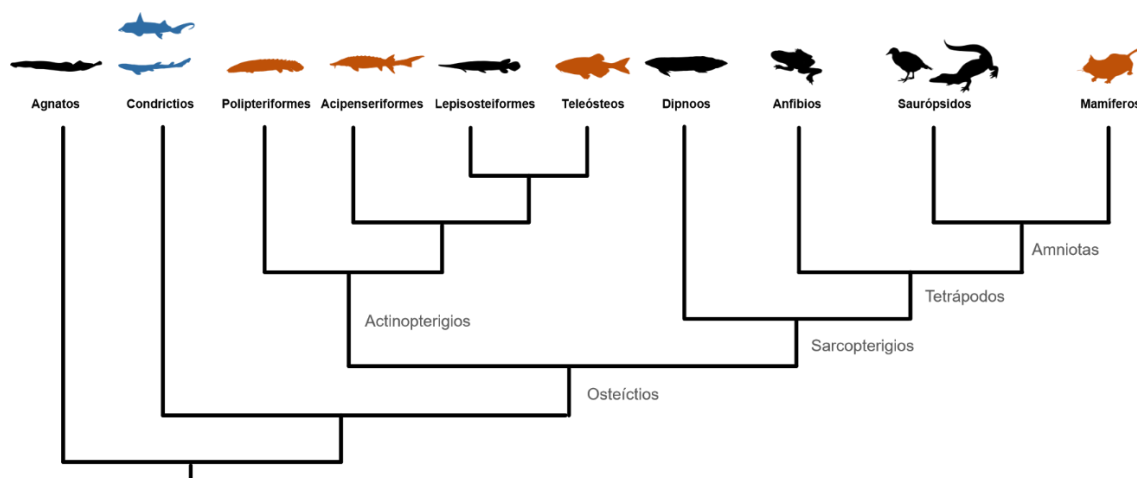


Figura 5. Filogenia modificada de los principales grupos de vertebrados atendiendo a los resultados de Meyer y Zardoya (2003), Takeaki et al. (2003); Blair y Hedges (2005) y Broughton et al. (2013). En la presente tesis se han estudiado especies pertenecientes a varios de estos grupos, de entre los cuales se ha prestado especial atención a los condriictios (en color azul). Además, y con fines comparativos, se han examinado representantes de polipteriformes, acipenseriformes, teleósteos y mamíferos (en color naranja).

Los condrictios como modelo animal de investigación

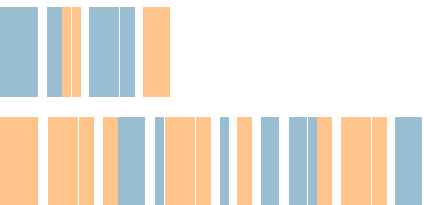
Los condrictios, y en concreto los elasmobranquios, no solo han sido un modelo animal en el estudio morfológico comparado del sistema cardiovascular, sino que también han sido utilizados en diferentes trabajos sobre el desarrollo embrionario de la retina (Bejarano-Escobar et al., 2012), del sistema visual (Bejarano-Escobar et al., 2013), de la dentición (Debiais-Thibaud et al., 2015), de las placodas sensoriales (O'Neill et al., 2007) o del sistema linfático (Lloyd-Evans, 1993), entre otros.

La elección del modelo condrictio en la mayoría de estos trabajos se debe a la interesante posición filogenética del grupo, ya que, tal como se ha indicado en la sección anterior, los condrictios son considerados como el grupo hermano del resto de los gnatostomados. Este hecho permite estudiar el estado primitivo de diversos caracteres y discutirlos bajo una óptica evolutiva. De esta forma, mediante métodos de comparación con otros modelos animales como el pez cebra, *Xenopus*, el pollo o el ratón se puede inferir la dinámica evolutiva de diferentes procesos y estructuras, a nivel morfológico, molecular y embriológico.

Pese a las limitaciones técnicas actuales, tales como la falta de especies con genomas completamente secuenciados o la dificultad para hallar anticuerpos comerciales específicos, este modelo sigue constituyendo una herramienta útil en los estudios de morfología comparada. Se espera que, poniendo a punto y aplicando nuevas técnicas en el modelo condrictio, desarrolladas con anterioridad en otros modelos animales, se puedan reportar resultados que permitan arrojar luz sobre problemáticas de diversa índole.

Capítulo II

Objetivos Generales





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tal como se ha indicado en la introducción, los condriictios son considerados como un modelo de comparación idóneo para inferir la evolución de cualquier carácter morfológico, molecular o embriológico de los vertebrados.

A este respecto, aún existen diferentes cuestiones abiertas sobre el diseño primitivo del corazón de los vertebrados gnatostomados. La mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales convencionales, como el teleósteo *Danio rerio*, el anfibio *Xenopus laevis*, el ave *Gallus gallus* y diferentes especies de mamíferos. No obstante, hay una falta de conocimiento sobre el estado primitivo de los caracteres, que se asume fielmente reflejado en el modelo condriictio. Ello ha impedido inferir la polaridad evolutiva de los caracteres cardiacos en los gnatostomados. La presente tesis pretende estudiar diferentes aspectos sobre la morfología, la composición molecular y el desarrollo del corazón de los condriictios, de manera comparada con otros modelos animales, con el objetivo último de responder a tres cuestiones evolutivas, aún no resueltas, sobre la mioarquitectura y la vascularización del corazón de los gnatostomados.

La primera de las cuestiones versa sobre la histomorfología primitiva del miocardio ventricular. Se pretende arrojar más luz en el debate iniciado por [Farrell et al. \(2012\)](#) a razón de que la mioarquitectura ventricular primitiva en los gnatostomados es la mixta y no la trabeculada ([Farmer, 1997](#)). Para ello es preciso determinar cuál es la condición primitiva del carácter en los condriictios, para lo que se plantean estudios histológicos de los ventrículos cardiacos en el grupo hermano de los elasmobranquios, los holocéfalos.

La segunda cuestión pivota sobre la composición en isoformas de cadena pesada de miosina (MyHC) del corazón primitivo de los gnatostomados. Aún no se ha descrito la distribución de isomiosinas en el miocardio de los condriictios y otros grupos de actinopterigios no teleósteos. Esta información se erige de gran interés, ya que se ha observado que la distribución e identidad de isoformas de MyHC, tal y como representa el caso de *Xenopus* ([Garrick et al., 2005](#)), no es idéntica en todos los grupos de gnatostomados. Este hecho pone de manifiesto la falta de información y estudio sobre la evolución del miosinoma cardiaco en los vertebrados mandibulados. Por ello esta tesis, se plantea identificar y analizar la distribución de isomiosinas cardiacas mediante técnicas inmunohistoquímicas

y moleculares en corazones de ejemplares adultos de condriictios y otras especies representativas de gnatostomados.

La tercera y última cuestión trata sobre el desarrollo del miocardio en el corazón primitivo de los gnatostomados. Se han descrito dos modelos de formación de las trabéculas cardíacas (trabeculación) durante el desarrollo embrionario de los teleósteos (Liu et al., 2010; Peshkovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014) y de los tetrápodos (Sedmera et al., 2000; Icardo et al., 2011). Se ha comprobado que el inicio del proceso de trabeculación es diferente en estos dos modelos. Hasta el momento, no se ha discutido de forma explícita la relación evolutiva entre los procesos de trabeculación existentes en gnatostomados. Sobre la base de que los condriictios son el grupo hermano del taxón que engloba a los modelos donde se ha estudiado este proceso (teleósteos, aves y mamíferos), se pretende estudiar la trabeculación miocárdica en el modelo de condriictio *Scyliorhinus canicula*, con el objetivo de deducir el tipo de trabeculación primitivo, así como la evolución de este proceso a lo largo de la filogenia de los gnatostomados.

A tenor de los antecedentes expuestos en la introducción y las tres cuestiones que se acaban de plantear, en la presente tesis se proponen los tres siguientes objetivos:

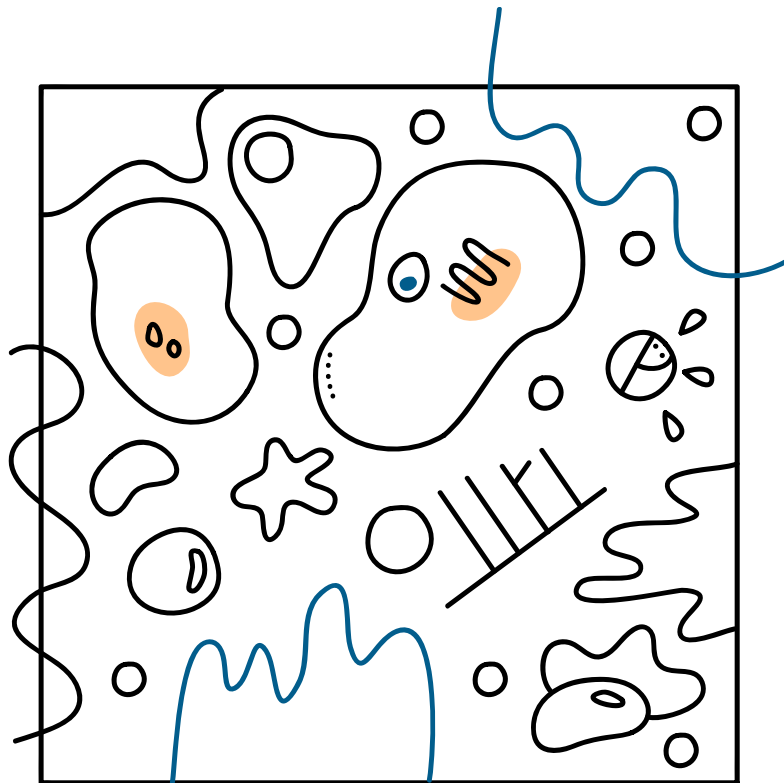
1. Describir la mioarquitectura y vascularización ventricular de los condriictios con el fin de inferir la condición primitiva del carácter y determinar su evolución en los vertebrados gnatostomados.

2. Analizar la distribución de isoformas de cadena pesada de miosina en el corazón en individuos adultos de un representante de los elasmobranquios, la pintarroja, así como en otras especies pertenecientes a otros grupos de gnatostomados y deducir la evolución del carácter dentro de los vertebrados mandibulados.

3. Estudiar el desarrollo temprano del miocardio ventricular de tipo mixto en la especie representativa de elasmobranquios elegida, para contribuir a esclarecer cuál es el tipo de trabeculación miocárdica más primitiva en los vertebrados gnatostomados.

Capítulo III

Estructura y vascularización del miocardio ventricular en los Holocéfalos: su significado evolutivo



Structure and vascularization of the ventricular myocardium in Holocephali: their evolutionary significance.

Ana Carmen Durán Boyero, Miguel Ángel López-Unzu López, Cristina Rodríguez Infantes, Borja Fernández Corujo, Miguel Lorenzale García, Andrea Linares Gámez, Francisca Salmerón Jiménez y Valentín Sans Coma.

Journal of Anatomy (2015) 226: 501-510.

DOI: [10.1111/joa.1231](https://doi.org/10.1111/joa.1231)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este capítulo se aborda el debate sobre qué mioarquitectura ventricular puede ser considerada primitiva en los vertebrados gnatostomados mediante el estudio de este carácter en los holocéfalos, el grupo hermano de los elasmobranquios.

Antecedentes

Como se ha indicado en la introducción, clásicamente se ha asumido que la mioarquitectura ventricular primitiva de los vertebrados consiste en un miocardio de tipo trabeculado carente de irrigación coronaria (Farmer, 1997, 1999). En estas circunstancias, tanto el miocardio como el resto del corazón deben tomar el oxígeno y nutrientes de la sangre luminal. Esta hipótesis se sustenta en que, a nivel filogenético, los agnatos poseen un ventrículo trabeculado y avascular (Yamauchi, 1980) y que, durante el desarrollo cardiaco, la trabeculación ocurre antes de la formación del miocardio compacto (Sedmera et al., 2000; Sedmera y Ostadal, 2012).

Actualmente, existe un debate abierto sobre la condición primitiva de este carácter debido a que, en la última década, Farrell et al. (2012) han sugerido que es más parsimonioso a nivel evolutivo que la mioarquitectura primitiva en los gnatostomados sea la de tipo mixto, es decir, la constituida por una capa miocárdica trabeculada interna que queda rodeada por un miocardio de tipo compacto profusamente irrigado por arterias coronarias.

Con el objeto de comprender mejor la evolución de la mioarquitectura ventricular en los vertebrados, se ha estudiado el miocardio y la vascularización coronaria del ventrículo de diversos holocéfalos, el grupo hermano de los elasmobranquios. En concreto, se ha descrito la mioarquitectura de cuatro especies: *Chimaera monstrosa*, *Hydrolagus affinis*, *Harriotta raleighana* y *Rhinochimaera atlantica*. Para ello, se han utilizado técnicas morfológicas (histoquímica) y morfo-moleculares (inmunohistoquímica). El conocimiento de la mioarquitectura del ventrículo de los holocéfalos se presenta como una pieza fundamental para inferir la mioarquitectura ventricular primitiva en los vertebrados mandibulados.

Resultados y discusión

Los corazones de las cuatro especies estudiadas constan de los mismos segmentos cardíacos observados en otros condrictios. De estos segmentos, en el presente trabajo se ha estudiado el ventrículo y el cono arterioso.

El miocardio ventricular de *C. monstrosa* es de tipo mixto al tener un miocardio trabeculado recubierto externamente por una delgada capa de miocardio compacto. Entre la capa compacta y el epicardio se sitúa un espacio subepicárdico, constituido por un tejido conjuntivo rico en colágeno y elastina. El corazón de esta especie presenta un sistema coronario bien desarrollado que parte de una rama lateral de las arterias hipobranquiales. Esta rama se bifurca en dos troncos coronarios que recorren todo el tracto de salida cardíaco hasta la unión conoventricular, donde estos se dividen en varias arterias de menor calibre. Dichas arterias irrigan todo el espesor del ventrículo, desde el subepicardio al subendocardio, incluyendo a la totalidad del miocardio mixto.

El miocardio ventricular de *H. raleighana* es asimismo mixto, pero con una capa compacta relativamente delgada. Entre la capa compacta y el epicardio se puede observar un espacio subepicárdico con abundante colágeno y elastina. Al igual que el caso anterior, los troncos coronarios recorren el tracto de salida cardíaco hasta el límite conoventricular, donde se dividen en múltiples ramas que irrigan todo el ventrículo, llegando a penetrar en la capa miocárdica trabeculada.

Por lo tanto, *C. monstrosa* y *H. raleighana* tienen una mioarquitectura que corresponde al tipo III definido por [Tota et al. \(1983\)](#), que es similar a la observada en la mayoría de los elasmobranquios ([Santer y Greer Walker, 1980](#)).

R. atlantica presenta un ventrículo carente de capa compacta, compuesto exclusivamente por miocardio trabeculado, con un subepicardio con abundante colágeno y elastina y con una gran densidad celular. Los troncos coronarios también recorren el tracto de salida de esta especie, pero estos dan lugar a ramas subepicárdicas que no llegan a penetrar en el miocardio. Debido a esta configuración, la mioarquitectura ventricular de esta especie corresponde a la descrita como tipo Ib por [Tota et al. \(1983\)](#).

Por último, a diferencia de las descripciones previas efectuadas por [Santer y Greer Walker \(1980\)](#), nuestras observaciones indican que el ventrículo de *H. affinis* presenta un miocardio exclusivamente trabeculado. El miocardio queda rodeado por un espacio subepicárdico similar al descrito en *C. monstrosa*. Los troncos coronarios en esta especie también recorren el tracto de salida hasta llegar al límite conoventricular, donde se dividen en múltiples arterias coronarias subepicárdicas que penetran en la capa trabeculada.

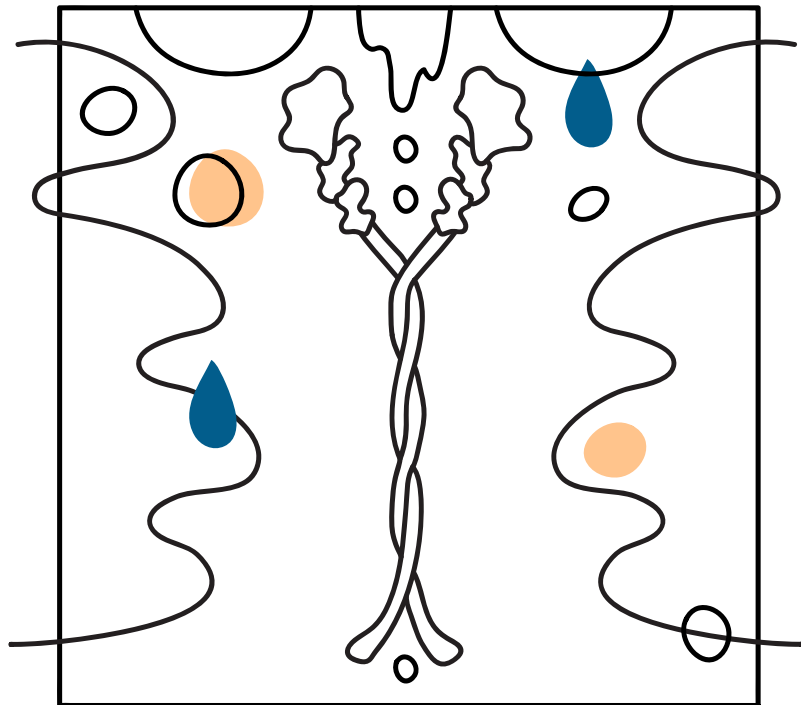
Esta mioarquitectura ventricular observada en *H. affinis*, un miocardio completamente trabeculado con una profusa irrigación coronaria, no se corresponde con ningún tipo descrito en la bibliografía. Este hallazgo cuestiona la noción clásica que asocia la presencia de un miocardio de tipo compacto con la de un sistema coronario desarrollado. Los presentes datos suponen una nueva evidencia que apoya la hipótesis sobre la formación del sistema coronario formulada por [Lavine et al. \(2008\)](#). Dicha hipótesis sugiere que los programas morfogenéticos responsables del desarrollo de miocardio compacto y el sistema coronario en vertebrados son independientes, aunque están íntimamente ligados.

Una de las limitaciones de este trabajo ha sido la imposibilidad de estudiar la mioarquitectura ventricular de representantes de todas las familias de holocéfalos. En este caso, se ha estudiado dos especies pertenecientes a los quiméridos (*C. monstrosa* y *H. affinis*) y otros dos de los rinoquiméridos (*R. atlantica* y *H. raleighana*), pero no ha sido posible acceder a muestras de la tercera familia, los callorínquidos. Afortunadamente se dispone de una descripción anterior de un callorínquido (*Callorhinchus milii*) realizada por [Davie y Farrell \(1991\)](#), quienes concluyeron que el ventrículo de esta especie consta de un miocardio mixto irrigado por un sistema coronario. Considerando de forma conjunta los resultados del presente capítulo y las observaciones realizadas en los callorínquidos, que son el grupo hermano del clado que engloba a los quiméridos y rinoquiméridos, se puede concluir que la mioarquitectura ventricular primitiva en los holocéfalos es de tipo mixto. Así pues, la ausencia de miocardio compacto ventricular y/o la falta de un sistema coronario que lo irrigue debe atribuirse a una pérdida secundaria.

Asumiendo que los condricios son el clado de gnatostomados más antiguo (Carroll, 1988; Venkatesh et al., 1999; Zardoya, 2001), y teniendo en cuenta la estructura miocárdica de los elasmobranquios descrita en la introducción, los presentes datos permiten proponer que la condición mixta es la mioarquitectura ventricular primitiva en los gnatostomados, tal como ya adelantaron Farrell et al. (2012). Sin embargo, aún ahora no es posible concluir definitivamente qué mioarquitectura ventricular es la primitiva en los vertebrados. Esto se debe a que los agnatos, considerados como el grupo hermano de los gnatostomados (Blair y Hedges, 2005), poseen un miocardio ventricular trabeculado y avascular (Farmer, 1999). Esta circunstancia abre la puerta a dos posibles hipótesis. La primera es que los agnatos actuales (mixines y lampreas) presentan una condición derivada con respecto a la del antecesor común con los gnatostomados. La segunda es que el miocardio mixto constituye una apomorfía de los gnatostomados.

Capítulo IV

Expresión diferencial de isoformas de cadena pesada de miosina en los segmentos cardiacos de vertebrados gnathostomados y sus implicaciones evolutivas



Differential expression of myosin heavy chain isoforms in cardiac segments of gnathostome vertebrates and its evolutionary implications

Miguel Ángel López-Unzu López, Ana Carmen Durán Boyero, Maria Teresa Soto Navarrete, Valentín Sans Coma y Borja Fernández Corujo.

Frontiers in Zoology (2019) 16: 18.

DOI: [10.1186/s12983-019-0318-9](https://doi.org/10.1186/s12983-019-0318-9)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este trabajo se describe la distribución de las diferentes isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC) en el miocardio de las regiones de entrada y de salida del corazón de los condriictos mediante técnicas proteómicas e inmunohistoquímicas. También se utiliza la afinidad del anticuerpo anti-MyHC A4.1025, estimada mediante inmunoprecipitación, para inferir la distribución de las isomiosinas rápidas y lentas en el corazón de distintos grupos de vertebrados.

Antecedentes

Actualmente se conoce que la distribución de isoformas de MyHC en el corazón de los vertebrados es heterogénea, siendo abundantes los ortólogos del gen humano *myh6* en el miocardio de la región de entrada y de *myh7* en el miocardio de la región de salida en varios grupos de vertebrados (teleósteos, aves y mamíferos). Se desconoce si esta distribución cardiaca de isomiosinas, a la que designaremos como convencional, está presente en condriictos.

El trabajo parte de unos resultados inmunohistoquímicos preliminares en los que se utilizaron dos anticuerpos anti-pan-MyHC, MF20 y A4.1025, en muestras de corazón de individuos adultos de un representante de los elasmobranquios, la pintarroja. Pese a que teóricamente ambos anticuerpos detectan la totalidad de isomiosinas sarcoméricas, los resultados que se obtuvieron fueron dispares, al marcarse con A4.1025 únicamente el miocardio del seno venoso y del atrio (región de entrada). Este resultado sugiere que, por un lado, estos anticuerpos presentan afinidades diferentes por distintas isoformas de miosina, al menos por las de la pintarroja. Por otro lado, en el corazón de la pintarroja debe existir una distribución de isoformas de MyHC diferente a la descrita en corazones de teleósteos, mamíferos o aves, en los que no se da esta característica inmunohistoquímica.

En el presente capítulo, se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas, *western blot*, *slot blot*, inmunoprecipitación, así como un estudio proteómico con el objetivo de comprobar si en el corazón de la pintarroja existe una distribución de isoformas de MyHC diferente a la descrita en corazones de otros

gnatostomados y explicar el marcaje diferencial con A4.1025 en el miocardio adulto de la pintarroja.

Resultados y discusión

Se usaron *western blots* para comprobar la especificidad de los anticuerpos (MF20 y A4.1025) para las MyHC de la pintarroja. Para ello, se utilizaron ambos anticuerpos en extractos de miosina de las regiones cardiacas de entrada y de salida de pintarroja. Como control, se empleó un modelo de mamífero, el hámster (*Mesocricetus auratus*). Los extractos se obtuvieron mediante el método descrito por [Margossian y Lowey \(1982\)](#). Los principales resultados fueron los siguientes 1) los *western blots* solo revelaron una única banda en todos los extractos de ambas especies con un peso molecular que coincidía con el descrito para las MyHC (220-250 kDa; [Sellers, 2000](#)) y 2) se observó la misma disminución en la marca del extracto de la región cardiaca de salida de pintarroja con el anticuerpo A4.1025 que la observada mediante inmunohistoquímica. Estos resultados permiten descartar que la diferencia de marcaje a nivel inmunohistoquímico fuese debida a efectos producidos por el tratamiento del tejido. Además, se confirmaba que ambos anticuerpos, MF20 y A4.1025, tienen afinidades diferentes para distintos epítomos de la proteína MyHC. Ya que MF20 reconoce un epítomo de la zona de la cola ([Bader et al., 1982](#)) y A4.1025 reconoce uno de la región de la cabeza globular ([Dan-Goor et al., 1990](#)), los resultados permiten concluir que ambos anticuerpos detectan isomiosinas diferentes en el miocardio de la pintarroja, pese a ser ambos considerados anti-pan-MyHC.

Con el fin de cuantificar de forma analítica la diferencia de marca con A4.1025 entre las regiones cardiacas de entrada y salida de la pintarroja, se realizó un *slot blot* con pruebas colorimétricas. Los resultados mostraron diferencias significativas entre ambas muestras con A4.1025 ($p=0,00001$), pero no con MF20 ($p=0,74183$).

Para poder identificar las isoformas de MyHC distribuidas diferencialmente en el polo de salida cardiaco de la pintarroja se aplicaron técnicas proteómicas, en particular cromatografía líquida. Inicialmente se utilizó

un sistema HPLC-ESI-MS/MS para la identificación de proteínas. Los datos de espectrometría de masas se compararon con la única base de datos de proteínas completa para condrictios, la del holocéfalo *Callorhinchus milii* (Vekantesh et al., 2014). Gracias a esta búsqueda, además de las isoformas esperadas (MYH6 y MYH7) se detectaron dos isoformas adicionales, MYH2 y MYH7B. Estos datos se comprobaron en una base de datos general de cordados. Debido a que el sistema HPLC-ESI-MS/MS utilizado no ofrece datos cuantitativos, se utilizó un sistema más preciso, sensible y con capacidad para cuantificar péptidos, ESI-Quadrupole-Orbitrap. Tras realizar las búsquedas en la misma base de datos de *C. milii*, el sistema Orbitrap encontró las mismas isoformas identificadas con el sistema HPLC-ESI-MS/MS. Además, la cuantificación mostró que, en la región cardiaca de entrada, MYH2 y MYH6 representan aproximadamente un 75% del total de miosinas, mientras que en la región cardiaca de salida cardiaco MYH7 y MYH7B representan cerca del 70%. Todos los datos obtenidos con ambos sistemas fueron estadísticamente significativos al tener un *ion score* superior a 20.

Los resultados del análisis proteómico indican que no todos los vertebrados comparten la distribución convencional de isomiosinas cardiacas observada en teleósteos, aves y mamíferos. A este respecto, *Xenopus* ya era considerado como una excepción a este patrón, al presentar MYH15 en lugar de MYH7 como isoforma principal en el ventrículo (Garriock et al., 2005).

MYH2 es una isomiosina rápida, abundante en la musculatura esquelética (Machida et al., 2002). Su detección en los condrictios indica que perdió su función contráctil en el corazón antes de la divergencia con los osteíctios, o bien que es una apomorfía de los condrictios. Por su parte, MYH7B es una isomiosina lenta y tónica, abundante en la musculatura lenta extraocular de vertebrados. Aunque se han llegado a detectar transcritos de esta isoforma en el miocardio embrionario y adulto de varias especies, nunca se había detectado la proteína (England y Loughna, 2013). Esta discordancia entre el ARNm y la proteína en el miocardio se ha explicado por la existencia de una zona de terminación prematura en el exón 7 del gen *myh7b*, que evita la expresión de la proteína. La maquinaria de *splicing* alternativo, que opera específicamente en parte de la musculatura esquelética extracardiaca, permite

la expresión de esta proteína en determinados músculos, pero no en el corazón (Bell et al., 2010). La detección de MYH7B tiene un interés especial debido a que su gen, al igual que *myh6* y *myh7*, dispone de un microRNA intrónico (MyomiR) denominado miR-499 que regula, además de la propia expresión de *myh7b*, la ruta de señalización de Sox6, relacionada con la diferenciación de la musculatura lenta y rápida (Wang et al., 2011). Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que MYH7B ha perdido su función contráctil en el corazón de varios grupos de gnatostomados. En estos grupos *myh7b* presentaría una función reguladora en el miocardio mediante miR-499.

Cabe recordar que la velocidad de contracción de MYH2 y MYH6 es más rápida que la de MYH7 y MYH7B (Alpert et al., 2002; England y Loughna, 2013). Por ello, pese a encontrar isoformas accesorias en las regiones cardiacas de entrada y salida de los conductos, se sigue manteniendo una zonación (isomiosina rápidas vs. lentas) identificada en otros grupos de vertebrados, en los que el miocardio atrial contiene isoformas más rápidas que el ventricular (England y Loughna, 2013). A la luz de estos datos se puede sugerir que esta configuración es un carácter compartido en los gnatostomados.

Finalmente, gracias a la capacidad del anticuerpo A4.1025 de discriminar isoformas de MyHC y con el propósito de realizar estudios comparativos entre grupos de vertebrados, se procedió a medir la afinidad de dicho anticuerpo por las diferentes isomiosinas de la pintarroja. Para ello, se combinaron la inmunoprecipitación, utilizando una columna tapizada con A4.1025, una cuantificación del extracto de miosinas eludido a través de ella. La afinidad sería la diferencia en la cuantificación de cada isoforma en el extracto inicial y el eludido. Este experimento concluyó que A4.1025 tiene una gran afinidad por las isoformas rápidas MYH2 y MYH6, siendo más del doble que por MYH7 y diez veces superior que por MYH7B.

Con estos datos se procedió a utilizar A4.1025 en técnicas inmunohistoquímicas con muestras de corazón de otros grupos de vertebrados. En teleósteos (*Danio rerio* y *Osteoglossum bicirrhosum*), acipenseriformes (*Acipenser naccarii*) y mamíferos (*M. auratus*), A4.1025 marca la totalidad del miocardio. Los conductos *Leucoraja circularis* y *Centrophorus granulosus*

presentan el mismo patrón que el observado en la pintarroja. Un tercer patrón se observó en muestras de corazón de polipteriformes (*Polypterus senegalus*). En esta especie el miocardio del seno venoso, atrio y cono arterioso estaba intensamente marcado, mientras que el del ventrículo no manifestaba ningún tipo de reacción. A la luz de estos resultados, procede interpretar que la condición detectada mediante análisis proteómico en la pintarroja, con cuatro isoformas cardíacas de MyHC, seguramente sea compartida por el resto de los condrictios. Esta distribución dista de lo descrito en los tetrápodos y teleósteos, los cuales parecen compartir el patrón de dos isoformas cardíacas convencionales con *A. naccarii*. En cambio, *P. senegalus* presenta un patrón diferente al resto de vertebrados, al tener un cono arterioso con una alta concentración de isoformas rápidas.

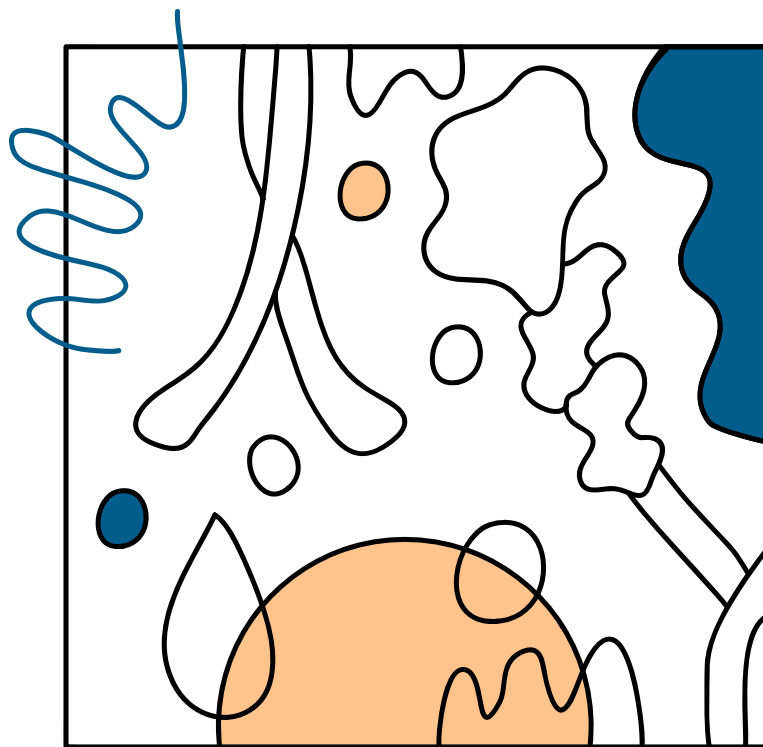
Estos hallazgos han permitido plantear una hipótesis que relaciona el tipo de diseño cardíaco con la distribución de isomiosinas. Tal como se ha mencionado en la introducción, se consideran corazones con diseño primitivo los que no están tabicados y que tienen un cono arterioso con una longitud elevada con respecto al tracto de salida completo. Los conos arteriosos largos presentan un tipo de contracción “peristaltóide” (Sudak, 1965). Además, este tipo de contracción, típico en el desarrollo cardíaco en varios grupos de vertebrados, precisa de isoformas de MyHC lentas como MYH7B (Sedmera, 2011; Warkman et al., 2012). Por este motivo, se ha propuesto la hipótesis que existe una relación funcional entre MYH7B y la contracción conal, que ha desaparecido en el diseño cardíaco derivado, es decir, sin un cono arterioso relativamente largo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo V

Isoformas de cadena pesada de miosina en el miocardio atrioventricular de *Scyliorhinus canicula*



Myosin heavy chain isoforms in the myocardium of the atrioventricular junction of Scyliorhinus canicula (Chondrichthyes, Carcharhiniformes)

Miguel Ángel López-Unzu López, María Teresa Soto Navarrete, Borja Fernández Corujo, Valentín Sans Coma y Ana Carmen Durán Boyero.

Journal of Fish Biology (2020) 1: 6.

DOI: [10.1111/jfb.14427](https://doi.org/10.1111/jfb.14427)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este trabajo se estudia la distribución de isoformas de cadena pesada de miosina (MyHC) en el segmento de transición que se interpone entre la región cardiaca de entrada y de salida de individuos adultos de un representante de los elasmobranquios, la pintarroja.

Antecedentes

Como se ha indicado en la introducción, el corazón lineal de los condrictios, como la pintarroja, está formado por diferentes segmentos cardiacos, denominados seno venoso, atrio, ventrículo, cono arterioso y bulbo arterioso. Mientras el seno venoso y el atrio constituyen la región cardiaca de entrada, el ventrículo y el tracto de salida (cono arterioso y bulbo arterioso) conforman la región cardiaca de salida. La transición entre las regiones de entrada y salida está constituida por la unión o región atrioventricular. Se ha propuesto que dicha unión atrioventricular es la responsable del retraso de la propagación del impulso cardiaco. Este retraso en el impulso es esencial para permitir la contracción acompasada de todo el miocardio (Franco et al., 2002).

En el capítulo anterior se explica cómo se consiguió averiguar la distribución de las cuatro isoformas de cadena pesada de miosina presentes en el miocardio de la pintarroja (MYH2, MYH6, MYH7 y MYH7B). Para ello se aplicaron técnicas proteómicas e inmunohistoquímica con el anticuerpo A4.1025 y su afinidad diferencial para MyHC rápidas y lentas.

El propósito de este capítulo es describir la distribución de las isoformas de MyHC en el miocardio atrioventricular, el cual se sitúa en la zona de transición entre un miocardio con una alta abundancia de MyHC rápidas (región de entrada) y otro con mayor concentración de isoformas lentas (región de salida). Para ello se han aplicado técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con el anticuerpo A4.1025, en corazones de individuos adultos de pintarroja.

Resultados y discusión

Cada segmento cardíaco de la pintarroja adulta presenta un miocardio con una histomorfología diferente. El miocardio sinusal es delgado y está formado por fascículos pequeños y aislados, el atrial es más grueso y con aspecto trabeculado (miocardio pectíneo), el ventrículo posee una mioarquitectura mixta y el cono arterioso tiene un miocardio completamente compacto. A diferencia del miocardio sinusal y el atrial, que son reactivos a A4.1025, el ventricular y el conal no lo son, a excepción de una pequeña porción que se encuentra en el ápice del ventrículo.

El estudio histomorfológico ha puesto de manifiesto que el miocardio atrioventricular es compacto y está profusamente irrigado por ramificaciones de la arteria coronaria ventricular izquierda. Los fascículos miocárdicos, dispuestos circunferencialmente, están envueltos en una red de colágeno, similar al intersticio muscular del atrio o del ventrículo, pero sin formar una cápsula de tejido conjuntivo que los aisle de ellos. A nivel tisular, el miocardio atrioventricular se encuentra en continuidad con el miocardio trabeculado del atrio y la capa trabeculada del ventrículo. Esta continuidad se ha observado en otras especies carentes de un sistema de conducción cardíaco especializado, como sucede en diversos teleósteos y en tetrápodos como *Xenopus laevis* (Icardo y Colvee, 2011; Jensen et al., 2012). Por el contrario, en mamíferos y aves, que poseen un sistema de conducción especializado, los miocardios atrial y ventricular se encuentran separados por tejido conjuntivo conspicuo, que independiza la conducción del impulso atrial del ventricular (revisado en Jensen et al., 2012).

Los resultados inmunohistoquímicos con A4.1025 muestran que el miocardio atrioventricular está dividido a nivel molecular en dos porciones, una atrial que es reactiva al anticuerpo y una ventricular que no lo es. Estos resultados, junto con los obtenidos en el capítulo anterior, permiten inferir que la porción atrial de la unión atrioventricular es rica en isoformas rápidas de MyHC como MYH2 y MYH6, mientras que la porción ventricular posee una elevada concentración de isomiosinas lentas (MYH7 y MYH7B). Estos datos sugieren la existencia de un patrón de contracción diferente en las dos porciones, estando acompañada la de la porción atrial con la contracción de la

región cardiaca de entrada y la contracción de la porción ventricular con la contracción de la región cardiaca de salida.

Los presentes resultados están en la misma línea de los hallazgos de [Franco et al. \(2002\)](#), quienes detectaron una concentración de transcritos y proteínas de MyHC en la unión atrioventricular menor que en la mayor parte del resto del corazón. Por ello atribuyeron a esta región una función ralentizadora del impulso cardiaco. Este patrón de distribución de isoformas de MyHC también aparece durante el desarrollo cardiaco de aves y mamíferos, en los que la distribución espacial en los segmentos cardiacos es similar a la de un corazón no tabicado (p. ej. Condrictrios). Concretamente, durante el estadio de corazón tubular, previo a la formación del sistema de conducción, el miocardio atrioventricular tiene entidad molecular propia, pero se encuentra en continuidad morfológica con los miocardios adyacentes ([Moorman y Lamers, 1994](#)).

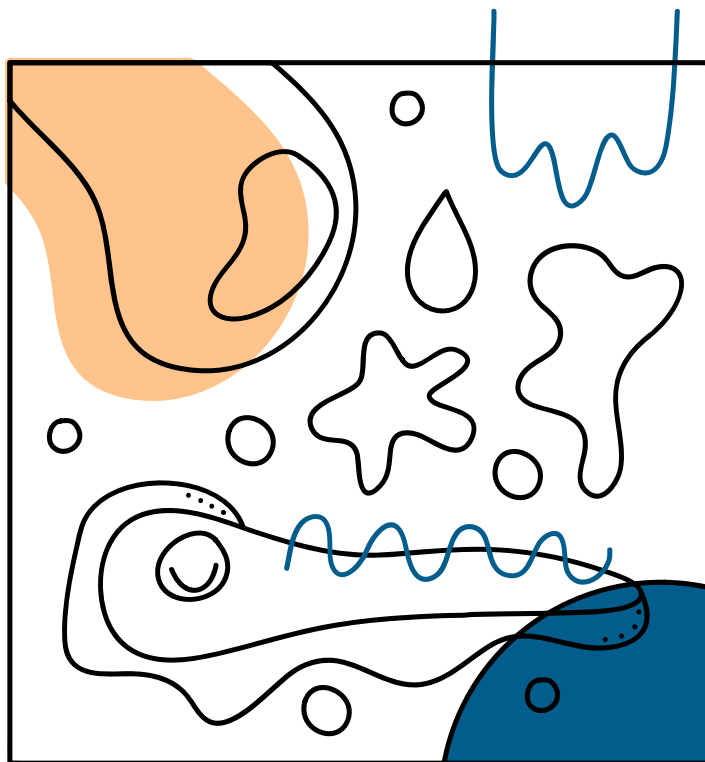
Toda esta información sugiere que la distribución heterogénea de isomiosinas cardiacas posibilitan la sincronización de la contracción cardiaca en los vertebrados que carecen de un sistema de conducción cardiaco especializado. Esta coordinación produciría la contracción asimétrica del miocardio atrioventricular, el cual se encuentra en continuidad con los miocardios de los segmentos adyacentes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo VI

Desarrollo de las trabéculas ventriculares en *Scyliorhinus canicula*: Implicaciones evolutivas



Development of the ventricular myocardial trabeculae in Scyliorhinus canicula (Chondrichthyes): Evolutionary implications

Miguel Ángel López-Unzu López, Ana Carmen Durán Boyero, Cristina Rodríguez Infantes, María Teresa Soto Navarrete, Valentín Sans Coma, Borja Fernández Corujo

Scientific Reports (2020) 10, 14434.

DOI: [10.1038/s41598-020-71318-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-71318-x)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este capítulo se estudia el desarrollo de las trabéculas del miocardio ventricular de tipo mixto en individuos adultos de un representante de los elasmobranquios, la pintarroja, y se compara con el desarrollo descrito en otros grupos de vertebrados con miocardios de tipo compacto y trabeculado.

Antecedentes

Como se explica en la introducción, en los vertebrados la formación de las trabéculas del miocardio ventricular se divide en tres fases: emergencia, trabeculación y remodelado. Estas fases se han establecido tras el estudio del desarrollo embrionario de dos modelos animales con miocardio ventricular compacto (*Gallus gallus* y *Mus musculus*) y en uno con miocardio trabeculado (*Danio rerio*). Sin embargo, este proceso varía entre estos modelos animales debido a que en el pez cebra la emergencia consiste en una delaminación de los miocardiocitos de la región ventricular (Liu et al., 2010; Peshkovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014) mientras que en los tetrápodos se debe a la invasión del miocardio por parte de las células endocárdicas (Sedmera et al., 2000; Icardo y Colvee 2011). Actualmente se desconoce gran parte de este proceso en modelos con un miocardio ventricular de tipo mixto. En este caso, tan solo hay una breve descripción en un trabajo de Muñoz-Chápuli et al. (1994) sobre el desarrollo general del corazón de la pintarroja.

Debido a que, en el contexto de la evolución del sistema cardiovascular de los vertebrados, y tal como se indica en el capítulo III, el miocardio ventricular mixto es considerado como la condición primitiva en los gnatostomados, es de especial interés el estudio de su desarrollo embrionario. Con el propósito de dilucidar el mecanismo de desarrollo del miocardio ventricular primitivo (de tipo mixto) en los gnatostomados, se ha estudiado de forma extensa el proceso de trabeculación en *S. canicula*. Para ello, se han utilizado técnicas morfológicas (histoquímica y microscopía electrónica de barrido), morfo-moleculares (inmunohistoquímica) y ultraestructurales (microscopía electrónica de transmisión).

El uso de este modelo animal es ventajoso para este objetivo al ser fácil de obtener y mantener sus embriones en cautividad, ya que es una especie

ovípara. Adicionalmente, presenta una ventaja clara para los estudios embriológicos, ya que existe una buena descripción de los estadios de desarrollo atendiendo a criterios morfológicos (Ballard et al., 1993).

Resultados y discusión

Los resultados muestran que el desarrollo temprano de las trabéculas miocárdicas del ventrículo cardiaco de *S. canicula* sigue las tres fases descritas en otros modelos como el pollo o el ratón.

La primera fase o emergencia ocurre durante el estadio de desarrollo 28. El estudio histológico con cortes semifinos pone de manifiesto que la pared cardiaca en este estadio se compone de tres capas: epicardio, miocardio y endocardio. El endocardio, formado por una monocapa de células, y el miocardio, constituido por dos o tres capas de miocardiocitos, quedan separados por una sustancia acelular, compuesta por glucosaminoglucanos y proteoglicanos, denominada gelatina cardiaca. En estadios de desarrollo sucesivos aparecen pequeños espacios en el miocardio que, vistos a microscopía electrónica de transmisión, se encuentran entre los miocardiocitos. En estas micrografías también se aprecian que, dentro de los miocardiocitos, se forman numerosas vesículas cerca de la membrana celular, lo que invita a pensar que el desarrollo de estos espacios intramiocárdicos es consecuencia de la secreción de las vesículas intracelulares a la matriz extracelular. Tras la aparición de estos espacios, la gelatina cardiaca empieza a reducir su grosor. Esto provoca contactos focales entre las células del endocardio y el miocardio en desarrollo. Posteriormente, las células endocárdicas invaden el miocardio, abriéndose paso entre los espacios intramiocárdicos ya formados. Esta invasión crea recesos en la superficie del miocardio ventricular que conectan los espacios intramiocárdicos con el lumen ventricular.

La fase de trabeculación es más sostenida el tiempo. Los resultados obtenidos con cortes semifinos e inmunohistoquímica muestran que el miocardio aumenta su grosor a causa del incremento en tamaño de los espacios intramiocárdicos. Estos espacios pasan a convertirse en cavidades, tal como ya adelantaron Muñoz-Chápuli et al. (1994). El crecimiento de las

cavidades provoca la aparición de dos capas miocárdicas, una externa continua y una interna discontinua, unidas por un conjunto de fascículos miocárdicos con disposición radial. Dichos fascículos, también denominados crestas, se han observado durante el desarrollo del miocardio ventricular de otros grupos de vertebrados (reptiles, aves y mamíferos), pero siempre con orientación dorsoventral. Actualmente se debate si estas crestas dorsoventrales están implicadas en el proceso de septación del ventrículo (Jensen et al., 2012).

El proceso de trabeculación termina con la fase de remodelado, durante la cual la capa miocárdica interna se convierte en una red de trabéculas miocárdicas ancladas a la capa continua externa. De forma paulatina, esta red de trabéculas adquiere la morfología definitiva de la capa trabeculada del miocardio mixto de la pintarroja. Posteriormente y de forma más acentuada tras la eclosión del animal, la capa miocárdica externa prolifera, aumentando su grosor. De este modo se origina la capa compacta definitiva del miocardio ventricular. Adicionalmente, los resultados con el anticuerpo anti-MyHC A4.1025 (véase en los capítulos IV y V) indican que la distribución de isomiosinas descrita en el capítulo IV se adquiere durante el estadio 34. Esto sugiere que justo antes de la eclosión, el corazón de la pintarroja experimenta un cambio de isoformas, redistribuyéndose las isomiosinas rápidas (MYH2 y MYH6) en la región de entrada y las lentas (MYH7 y MYH7B), no reactivas a A4.1025, en la región cardiaca de salida.

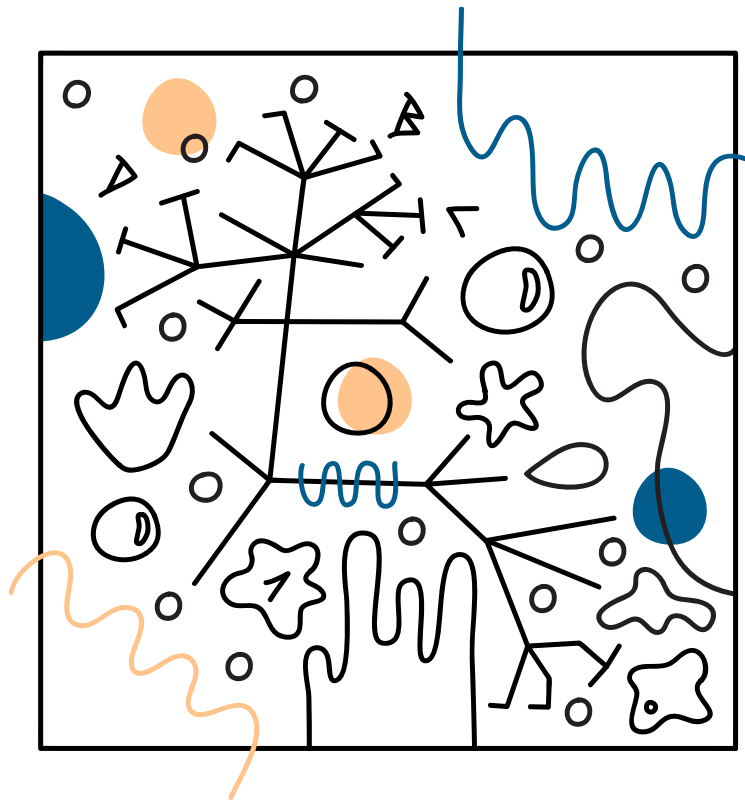
Estas fases de trabeculación del miocardio ventricular coinciden con las descritas en pollo y ratón, dos modelos animales con miocardio ventricular compacto estudiados hasta el momento (Icardo y Fernández-Terán, 1987; Kruithof et al., 2013). Al igual que sucede en los dos modelos de tetrápodos citados, al principio de su desarrollo, el miocardio ventricular de los embriones de pintarroja se compone de entre dos y tres capas celulares. El contacto focal de células endocárdicas con el miocardio en desarrollo observado en la pintarroja también guarda una gran similitud con el mecanismo denominado *touchdown*, descrito en el modelo ratón (Del Monte-Nieto et al., 2018). Sin embargo, el proceso general de trabeculación en la pintarroja, y en particular la fase de emergencia, diverge claramente del descrito en el pez cebra, que

constituye un animal modelo con miocardio mayoritariamente trabeculado y en el que la emergencia ocurre como una invaginación activa de los miocardiocitos en dirección al lumen (Liu et al., 2010; Peshovsky et al., 2011; Staudt et al., 2014). Por lo tanto, el presente estudio sugiere que el mecanismo de trabeculación se ha conservado desde grupos basales de vertebrados mandibulados hasta aves y mamíferos, mientras que la trabeculación en el pez cebra tiene lugar mediante un mecanismo derivado.

Los resultados de este estudio refuerzan la hipótesis propuesta en el capítulo III, que sostiene que el miocardio ventricular de tipo mixto es la condición primitiva en los gnatostomados. Por su parte, el miocardio trabeculado debe considerarse como una pérdida secundaria de la capa compacta que ha ocurrido de forma independiente en diversos grupos de gnatostomados, como polipteriformes, amiiformes, algunos teleósteos, dipnoos, anfibios y reptiles. Para comprobar si la pérdida de miocardio compacto está relacionada con el tipo de desarrollo de las trabéculas miocárdicas en el ventrículo, sería preciso averiguar cómo se forma el miocardio ventricular en grupos de teleósteos con miocardio mixto, así como en tetrápodos con miocardio de tipo trabeculado como anfibios y la mayoría de los reptiles actuales.

Capítulo VII

Discusión General





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los condriictios son el grupo hermano del resto de los gnatostomados, englobados bajo el clado de los osteíctios (Carroll, 1988; Venkatesh et al., 1999; Meyer y Zardoya, 2003; Takeaki et al, 2003; Blair y Hedges, 2005; Broughton et al, 2013). Es por este motivo que, tal como se ha ido introduciendo en los diferentes capítulos de la presente tesis, se asume que el corazón de los condriictios es el que mejor refleja la condición primitiva de diferentes caracteres anatómicos, histomorfológicos y moleculares del corazón de los gnatostomados.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis y en distintos trabajos previos indican que el corazón de los condriictios y, por lo tanto, el diseño hipotético del corazón del antecesor común de los gnatostomados presenta las siguientes características:

1) Es un corazón no tabicado, constituido por cinco segmentos cardiacos denominados, en sentido caudo-cefálico, seno venoso, atrio, región atrioventricular, ventrículo y tracto de salida. El tracto de salida está formado, a su vez, por dos elementos, un cono arterioso, proximal y miocárdico, y un bulbo arterioso, distal y generalmente elástico.

2) El miocardio tiene una histomorfología diferente en cada segmento: el miocardio sinusal está formado por haces musculares dispersos, el atrial es de tipo trabeculado, el ventricular es de tipo mixto y el conal es compacto.

3) La distribución de isoformas de MyHC presenta ya el patrón general que seguirá en el resto de los gnatostomados, es decir, presenta una mayor abundancia de isomiosinas rápidas en la región de entrada (seno venoso y atrio) y lentas en la región de salida (ventrículo y cono arterioso). Sin embargo, además de las isoformas convencionales (MYH6 y MYH7), presenta dos isoformas adicionales, la isomiosina rápida MYH2 y la lenta-tónica MYH7B.

4) La región atrioventricular es de naturaleza miocárdica y está en continuidad tanto con el miocardio atrial como con el ventricular. El miocardio atrioventricular consta de dos porciones, una atrial y otra ventricular, que son únicamente diferenciables a nivel molecular, debido a la expresión heterogénea de isoformas de MyHC. En la porción atrial de la región atrioventricular se

expresan de forma mayoritaria isoformas de MyHC rápidas. En cambio, en la porción ventricular, son las isomiosinas lentas las predominantes.

5) Durante el desarrollo temprano del miocardio ventricular de tipo mixto, en concreto la formación de las trabéculas miocárdicas (trabeculación) acontece por una invasión de las células endocárdicas del miocardio en desarrollo. Este proceso es similar al descrito en aves y mamíferos y diferente al que se produce en teleósteos.

Durante la evolución de los gnatostomados se han originado los diferentes tipos anatómicos de corazón, desde los corazones sin septación interna hasta los totalmente tabicados. A continuación, se discutirán en conjunto los distintos aspectos sobre la evolución cardiaca de los vertebrados que pueden desprenderse de los cuatro capítulos centrales de la presente tesis.

Evolución del miocardio ventricular y su vascularización

Los resultados de los capítulos III y VI sustentan la hipótesis planteada por [Farrell et al. \(2012\)](#) según la cual la mioarquitectura mixta constituye la condición primitiva dentro de los gnatostomados.

A tenor de las evidencias aportadas por [Farrell et al. \(2012\)](#) y las aportadas en esta tesis, la mioarquitectura ventricular trabeculada, presente en grupos de vertebrados tan diversos como condriictios ([Agnisola y Tota, 1994](#)), polipteriformes ([Noak et al., 1996](#); [Nelson, 2006](#); [Takeuchi et al., 2009](#); [Hughes et al., 2018](#)), lepisosteiformes y amiiformes ([Santer y Greer Walker, 1980](#)), teleósteos ([Santer y Greer Walker, 1980](#)), dipnoos ([Bugge, 1961](#); [Johansen y Burggren, 1980](#); [Icardo et al., 2005](#)), anfibios ([Martin, 1893](#); [Halpern y May, 1958](#); [Ostadal et al., 1970](#)) y reptiles ([MacKinnon y Heatwole, 1981](#)), debe ser considerada como una pérdida secundaria de la capa miocárdica compacta.

De la misma forma, la mioarquitectura ventricular puramente compacta, como la observada en aves y mamíferos, también debe ser considerada como una condición derivada dentro de los gnatostomados. Sin embargo, los criterios morfológicos actuales para definir cada una de estas mioarquitecturas no están

estandarizados. La diversidad de tipos de miocárdicos ventriculares y su análisis comparativo en un contexto evolutivo ponen de manifiesto la necesidad de una actualización de dichos criterios morfológicos y, por lo tanto, de la clasificación propuesta por [Tota et al. \(1983\)](#), que reconoce cuatro tipos de mioarquitectura ventricular en vertebrados pisciformes.

El principal problema de este sistema de clasificación proviene de la falta de consenso sobre cómo discriminar un miocardio de tipo mixto de uno puramente compacto o trabeculado. Esto es debido a que todos los miocardios compactos descritos en corazones de vertebrados presentan en su cara luminal una capa trabeculada reducida. Por otra parte, en todos los miocardios ventriculares de tipo trabeculado se observa que se encuentran externamente rodeados por una capa delgada pero continua de miocardio no trabeculado. En concreto, en este segundo caso, la capa externa de miocardio ha sido considerada de tipo compacto en algunas especies como el pez cebrá ([Hu et al., 2000](#)). Todo ello ha aumentado la confusión sobre los diferentes morfotipos del miocardio ventricular. La indefinición del tipo mioarquitectónico mixto también se pone de manifiesto en algunas de las imágenes tomadas a lo largo de la presente memoria. Esto no es un hecho menor, sobre todo en casos como la mioarquitectura ventricular de *H. affinis*, donde el miocardio ventricular, bajo los criterios morfológicos actuales, carecería de una capa compacta. Sin embargo, se puede apreciar que posee una fina capa de miocardio continuo que conecta con la base de las trabéculas (véase Figura 4c en el artículo original del capítulo III). Es esta capa de miocardio, externa y continua, la que ha sido considerada como una verdadera capa compacta en los corazones algunos teleósteos ([Hu et al., 2000](#)), por lo que no queda claro si esta mioarquitectura ha de ser considerada como trabeculada o mixta.

En los diferentes trabajos descriptivos sobre la mioarquitectura ventricular se han propuesto diversos métodos para identificar y cuantificar objetivamente la capa compacta. Para ello, es esencial determinar el límite entre la capa compacta y la capa trabeculada. A nivel histológico esto se ha intentado mediante análisis de imagen. Sin embargo, estas técnicas han resultado dificultosas y frecuentemente imprecisas ([Farrell et al., 2007](#)). Otra de las técnicas empleadas ha sido la propuesta por [Simonot \(2005\)](#), basada en la

separación del miocardio compacto y el trabeculado mediante la fijación del tejido en etanol 70°. No obstante, esta metodología parece haber caído en desuso debido a su falta de reproducibilidad. Actualmente, el uso de marcadores miocárdicos específicos combinados con técnicas de análisis de imagen posibilitarían este tipo de estudios.

Uno de los marcadores más prometedores que se han propuesto para identificar el miocardio compacto es *Hey2*. Este gen se expresa de forma específica en los miocardiocitos en desarrollo de la capa compacta de mamíferos (Koibuchi et al., 2007) y cocodrilos (Jensen et al., 2018). Sin embargo, no se ha detectado la expresión del ortólogo de *Hey2* en *D. rerio* (*gridlock*) en su miocardio ventricular (Jensen et al., 2018). Hasta el momento, parece que *gridlock* solo se ha detectado en el corazón durante el ensamblaje primario de la aorta ventral (Zhong et al., 2000, 2001), por lo que no parece ser un marcador efectivo para diferenciar el miocardio compacto en todos los grupos de vertebrados.

En definitiva, a la luz de los presentes resultados y los datos obtenidos de la bibliografía carece de sentido reconocer solo tres tipos discretos de miocardio ventricular (trabeculado, mixto y compacto). A este respecto parece más conveniente considerar que las diferentes mioarquitecturas ventriculares de los vertebrados son expresiones de un continuo anatómico (Figura 6), que va desde un miocardio formado por una compacta extremadamente delgada y una gruesa capa trabeculada (p. ej., pez cebra) a un miocardio compuesto por una compacta bien desarrollada y una trabeculada de pequeño tamaño (p. ej., mamíferos). Los tipos intermedios del continuo estarían representados por un miocardio ventricular con una esponjosa más o menos extensa en comparación con la compacta (p. ej., condrictios). Por lo tanto, todo miocardio ventricular debería considerarse de tipo mixto, al estar compuesto por dos capas, la compacta y la esponjosa. En consecuencia, deberían eliminarse los conceptos de miocardio puramente esponjoso y miocardio puramente compacto. En este ámbito, debe tenerse en cuenta otro rasgo para clasificar la mioarquitectura ventricular. Una característica común que podría ser utilizada para la descripción de la mioarquitectura es el del aporte sanguíneo a la pared ventricular. Como ya expusieron Tota et al. (1983) al describir la

mioarquitectura ventricular de los vertebrados pisciformes, la ausencia o presencia de arterias coronarias y, en este último caso, la distribución de los vasos, constituyen un carácter idóneo para establecer diferentes patrones miocárdicos. De esta forma, toda la diversidad de mioarquitecturas ventriculares encontradas en los vertebrados podría quedar clasificada en cuatro tipos morfológicos (A-D) atendiendo únicamente a un carácter fácilmente evaluable como es la distribución de los vasos coronarios (Figura 6). El tipo A quedaría caracterizado por un miocardio completamente avascular que englobaría al antiguo tipo Ia. El miocardio de tipo B solo presentaría arterias coronarias epicárdicas y subepicárdicas, es decir, como los antiguos tipos Ib y Ic. El tipo C englobaría aquellos miocardios con irrigación coronaria en la capa compacta, ya sea esta una capa conspicua o no, asimilándose al antiguo tipo II. Por último, el tipo D agruparía a los miocardios antes clasificados como de tipo III y IV, caracterizados por una irrigación coronaria que llegaría hasta la capa trabeculada.

Esta nueva visión sobre la mioarquitectura ventricular no alteraría la hipótesis evolutiva planteada en la presente tesis, relativa a la variación morfológica del miocardio ventricular en los gnatostomados. Todos los tipos miocárdicos observados en los gnatostomados provendrían de una condición primitiva, un miocardio de tipo mixto con una capa compacta relativamente gruesa y una irrigación coronaria conspicua. Esta condición primitiva habría experimentado cambios en la proporción relativa de su capa compacta y en el grado de vascularización coronaria a lo largo de la evolución cardíaca.

Es preciso remarcar que, a la luz de los resultados embriológicos expuestos en el capítulo VI, existen diferencias en el proceso de trabeculación entre las mioarquitecturas ventriculares conocidas actualmente como mixta/compacta y el miocardio ventricular de tipo trabeculado. Estos resultados sugieren que, pese a que las diferentes mioarquitecturas ventriculares de los vertebrados son expresiones de un continuo anatómico, la capa trabeculada no se forma mediante el mismo proceso de desarrollo en todas ellas.

Otra ventaja de la nueva clasificación propuesta aquí es que englobaría y facilitaría la comprensión en cuanto a la formación de mioarquitecturas ventriculares minoritarias, como la ya mencionada en *H. affinis* (capítulo III).

Además, no variaría las conclusiones extraídas del capítulo, ya que esta mioarquitectura continuaría constituyendo una evidencia de que un sistema coronario desarrollado no tiene por qué estar acompañado por un miocardio compacto conspicuo.

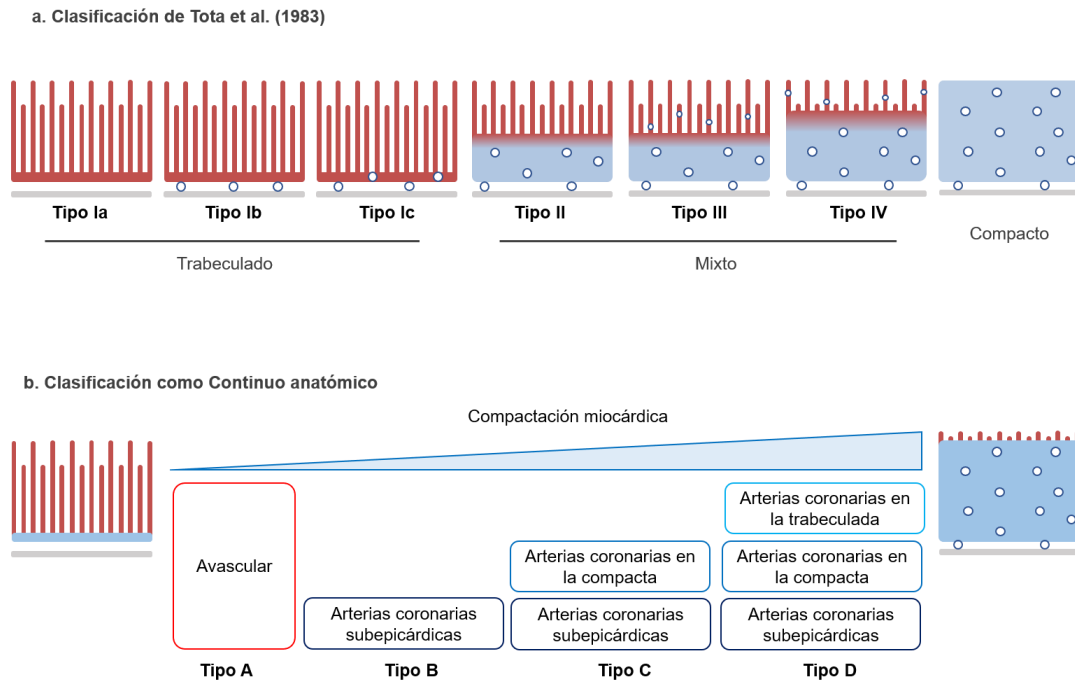


Figura 6. (a) Tipos de mioarquitectura ventricular según *Tota et al. (1983)* atendiendo al tipo de miocardio y su irrigación. (b) Nueva propuesta de tipos de mioarquitectura ventricular como “continuo anatómico” asumiendo que todos los miocardios ventriculares son mixtos y solo deben ser clasificados según su irrigación coronaria.

Merece la pena destacar que aún se precisa de información para comprender mejor la evolución de la compactación del miocardio ventricular en los vertebrados y cómo se relaciona con el desarrollo de la irrigación coronaria. Los resultados reflejados en el capítulo VI sugieren que el comienzo de la compactación del miocardio ventricular de la pintarroja comienza justo antes de la eclosión del animal y debe finalizar después de la eclosión. Estos datos indican que el desarrollo del miocardio concluye cuando el animal ya ha completado su desarrollo embrionario. A este respecto sería de gran interés

conocer el desarrollo temporal de las arterias coronarias y su relación con el proceso de compactación miocárdica en el ventrículo de la pintarroja.

Evolución del desarrollo del miocardio ventricular

Otra evidencia que sostiene la hipótesis de [Farrell et al. \(2012\)](#) sobre la condición primitiva del miocardio ventricular de tipo mixto, que se discute en el capítulo VI, se basa en el hecho de que la formación del miocardio ventricular en el pez cebra difiere de la descrita en la pintarroja, el pollo y el ratón. Esto sugiere la existencia de una divergencia significativa entre los teleósteos, con un ventrículo totalmente trabeculado (con una capa compacta mínima), y los restantes gnatostomados con respecto al mecanismo morfogenético responsable de la mioarquitectura ventricular.

Sin embargo, recientemente se han detectado similitudes moleculares entre los procesos de trabeculación del pez cebra y del ratón, lo que podría interpretarse como una evidencia de un mecanismo morfogenético común. Específicamente, la vía Notch1 regula la interacción entre las células endocárdicas y miocárdicas, y la ruta Nrg/ErbB2/ErbB4 facilita la división celular orientada de los miocardiocitos durante la trabeculación en ambos modelos animales ([D'Amato et al., 2015](#); [Samsa et al., 2015](#); [Uribe et al., 2018](#); [Fukuda et al., 2019](#)). No obstante, los patrones temporales y espaciales de activación de estas rutas de señalización difieren entre ambos modelos de manera significativa. Por un lado, en el ratón, Notch1 está activo en el endocardio durante la emergencia temprana y se restringe a la base de las trabéculas, mientras que en el pez cebra no está activo durante el período de trabeculación ([Samsa et al., 2015](#)). Por otro lado, la ruta Nrg/ErbB2/ErbB4 está activa en la punta de las trabéculas en crecimiento en el caso del ratón y en la base de las trabéculas en el caso del pez cebra. Esta diferencia espacial y temporal en la expresión de ambas rutas de señalización puede ser el origen del nuevo tipo de trabeculación, basada en la división orientada de los miocardiocitos, que aparece en los gnatostomados con miocardios de tipo trabeculado ([Uribe et al., 2018](#)).

La similitud en las rutas Notch1 o Nrg/ErbB2/ErbB4 no debería esgrimirse como una evidencia de homología entre la trabeculación del pez cebra y el ratón. Sin embargo, cambios en los distintos patrones de activación de las rutas moleculares comunes implicadas en los mecanismos celulares responsables de la trabeculación pueden explicar los cambios morfogénéticos observados durante la evolución de los vertebrados. Para establecer una relación de causalidad son necesarios más estudios en diversos modelos animales, especialmente en vertebrados con caracteres primitivos como los condricios, para comprender cómo han evolucionado los programas de desarrollo de la trabeculación en los vertebrados y conocer si son realmente responsables de la divergencia que se observa en el pez cebra.

Por ello, pese a que el pez cebra es un modelo animal ampliamente extendido (Bakkers, 2011; Beffagna, 2019; Giardoglou y Beis, 2019), la divergencia entre esta especie y otros modelos de vertebrados en lo relativo al desarrollo de la mioarquitectura ventricular pone de manifiesto ciertas limitaciones para su uso en el estudio de miopatías cardíacas humanas. La presente tesis no busca cuestionar los muchos beneficios que esta especie ha aportado a la investigación cardiovascular básica. Sin embargo, las mencionadas limitaciones son lo suficientemente importantes como para tenerlas en cuenta, debido a que la morfogénesis de la mioarquitectura ventricular de este modelo de teleosteo no se corresponde con el mecanismo primitivo de los gnatostomados, que es el que se ha conservado hasta los mamíferos, incluido el hombre.

Evolución del miosinoma cardiaco

Los resultados mostrados en el capítulo IV indican que la condición primitiva de la distribución de isoformas de MyHC en el corazón de los gnatostomados es un patrón (miosinoma) de cuatro isomiosinas: MYH2, MYH6, MYH7 y MYH7B. Mientras las isoformas rápidas (MYH2 y MYH6) abundan en la región de entrada, las lentas (MYH7 y MYH7B) están más concentradas en la región cardiaca de salida.

Esto sugiere que el miosinoma cardíaco en vertebrados, como ocurre durante la maduración de otras fibras esqueléticas especializadas ([Schiaffino & Reggiani, 2011](#)), ha evolucionado de un miosinoma cardíaco complejo (ver capítulo IV) a un patrón con un número reducido de isomiosinas, como se observa en los corazones de pez cebra, aves y mamíferos.

Los hallazgos obtenidos mediante técnicas de proteómica cuantitativa suscitan dos cuestiones. Primera cuestión, los resultados no explican por qué grupos filogenéticamente tan distantes como los tetrápodos y los teleosteos comparten la misma distribución de isoformas de MyHC cardíacas (MYH6/MYH7). Y ello habida cuenta de que la condición primitiva del carácter consiste en una mayor variabilidad de isoformas cardíacas. Esta incógnita se acentúa con el hecho de que la morfología y la contracción de ambos tipos de corazones son diferentes, al tratarse de un corazón no tabicado en el caso del pez cebra, y de un corazón completamente tabicado en el caso de aves y mamíferos. Merece la pena destacar que las aves y los mamíferos son vertebrados endotermos, lo que significa que pueden mantener su temperatura corporal independientemente del ambiente. Aunque evolutivamente la endotermia apareció de forma independiente en los grupos de los que derivan las aves y los mamíferos ([Faure-Brac y Cubo, 2020](#)), la transición a la endotermia está asociada con adaptaciones cardíacas comunes en ambos grupos, como un aumento en la capacidad de bombeo cardíaco ([Kroneman et al., 2018](#)) que resulta en una mayor eficiencia en la contracción ([Jensen et al., 2012](#)). Sin embargo, aunque las aves y los mamíferos comparten la endotermia, el pez cebra no cumple con esta característica. No obstante, el pez cebra es una especie que habita en ambientes cálidos y es relativamente activo. De esta forma, se puede sugerir que existe una relación evolutiva entre el miosinoma cardíaco y la temperatura corporal. Una evidencia clara a favor de esta hipótesis es el trabajo de [Vornanen \(1994\)](#), en el que se evalúa el efecto de la adaptación térmica en el conjunto de isomiosinas cardíacas de la carpa (*Carassius carassius*). Sus resultados muestran que, al aumentar la temperatura del agua, el miosinoma cardíaco de la carpa varía, pasando de tener una sola isoforma de MyHC a dos. Adicionalmente, merece la pena destacar que estas dos isomiosinas presentan una movilidad electroforética

similar a las isomiosinas cardiacas de los mamíferos. Debido a la escasa información sobre la relación entre la distribución de isomiosinas cardiacas y la temperatura corporal, y del miosinoma cardiaco en general, se desconoce si la expresión de un determinado miosinoma cardíaco en los vertebrados depende de la posición filogenética de la especie, de su temperatura corporal o de ambos.

La otra cuestión que permanece abierta se refiere a la detección de MYH2 y MYH7B en el corazón de ejemplares adultos de condrictios. La expresión de MYH2 en el corazón de los vertebrados se restringe al desarrollo de las fibras de Purkinje ([Machida et al., 2002](#)). Tal como se indica en el capítulo VI, esta isomiosina ha debido perder su función contráctil en el miocardio a lo largo de la evolución de los gnatostomados y se ha limitado a ser una isoforma transitoria durante el desarrollo del sistema de conducción cardiaco. A este respecto sería de gran interés identificar el miosinoma cardiaco de otras especies de vertebrados en las que no existan componentes morfológicos del sistema de conducción cardiaco, como nodos o haces, y estudiar qué función puede tener MYH2 en los miocardiocitos en los que se expresa.

En el corazón de aves y mamíferos, MYH7B se restringe a la etapa embrionaria, mientras que en el adulto solo se expresa su microRNA anidado (MiR-499), un regulador de la diferenciación de la musculatura rápida mediante la ruta de Sox6. La expresión ectópica de esta isoforma causa diferentes enfermedades congénitas cardiacas en el hombre, como es el caso del síndrome QT, en el que el corazón se contrae de forma irregular, o anomalías congénitas en la compactación miocárdica ventricular. La etiología de estas patologías parece tener su origen en las diferencias motoras de MYH7B, una isoforma especialmente lenta y de contracción sostenida (tónica), que parece provocar problemas durante la fase de diástole ([Peter et al., 2019](#)).

Por este motivo, la identificación de un modelo animal adulto que expresa MYH7B en su miocardio puede suponer una valiosa herramienta en el estudio de estas cardiopatías minoritarias. Las peculiaridades morfológicas y funcionales del corazón de los condrictios pueden ayudar a conocer los mecanismos etiofisiopatológicos de estas enfermedades. De la misma manera,

el estudio del modelo conditio puede ayudar a descifrar qué subyace a la selección evolutiva de MYH6 y MYH7 como isomiosinas cardíacas principales en diferentes grupos de vertebrados, así como las ventajas que pueden aportar en corazones de tipo tabicado (tetrápodos) o con un cono arterioso prácticamente virtual (pez cebra).

Evolución de la contracción y el tracto de salida cardíaco

En trabajos anteriores ya se había sugerido que una tendencia evolutiva del tracto de salida cardíaco en vertebrados mandibulados consiste en la reducción del cono arterioso (Santer et al., 1985; Lorenzale et al., 2017, 2018a, 2018b; Rodríguez et al., 2017). Pese a que la presente tesis no trate este aspecto de forma explícita, parece que existe una relación estrecha entre la distribución de isoformas de MyHC (miosinoma) cardíacas, el tipo de contracción del corazón y la longitud del cono arterioso.

Como se discute en el capítulo IV, nuestros resultados sugieren que la presencia de MYH7B en corazones con un diseño primitivo, véase corazones no tabicados con un cono arterioso largo, puede guardar relación con la contracción de tipo “peristaltoide” del polo de salida. Esta hipótesis se sustenta en que la contracción del miocardio atrial y ventricular difiere de la del cono arterioso. Mientras que el atrio y el ventrículo funcionan como segmentos sincrónicos de contracción rápida e isométrica, el cono arterioso es un segmento de contracción lenta y “peristaltoide”. La contracción conal se ha relacionado con tres posibles funciones: 1) cámara cardíaca accesoria (Sudak, 1965), 2) reservorio de presión sanguínea, que ayuda a minimizar las fluctuaciones de la presión protegiendo a los vasos branquiales (Keith, 1924; Daniel, 1934) y 3) capacita la función de las válvulas conales (Satchell y Jones, 1967; Schib et al., 2002). Para confirmar que existe una relación funcional entre la expresión de MYH7B y el tipo de contracción cardíaca es preciso conocer el miosinoma cardíaco de corazones con un diseño primitivo y de otros con un cono arterioso reducido. A este respecto, los grupos de vertebrados pisciformes estudiados en el trabajo de Maldanis et al. (2016) pueden ser candidatos de gran interés para un análisis comparado de su miosinoma cardíaco. En este

artículo se apoya la hipótesis de que el tracto de salida cardiaco de los acipenseriformes, los amiiformes y los teleósteos ha experimentado una reducción en el número de hileras de válvulas conales. Esta reducción es considerada como una condición derivada del diseño primitivo cardiaco, caracterizado por una elevada cantidad de hileras de valvas conales [Maldanis et al. \(2016\)](#). La ausencia de MYH7B en los corazones de los acipenseriformes, los amiiformes o los teleósteos sería una evidencia a favor de que existe ciertamente una relación de tipo funcional entre esta isomiosina y los corazones de gnatostomados con un diseño primitivo.

Por último, nuestros resultados sobre la comparación del miosinoma cardiaco de los condriictios (Capítulos IV y V), así como la localización heterogénea de las isomiosinas en el miocardio, deben evaluarse más allá de su relación con un tipo concreto de contracción cardiaca. Tal y como se ha mencionado en la introducción, los corazones de condriictios carecen de un sistema de conducción cardiaco constituido por elementos morfológicos especializados. Es decir, a diferencia de los amniotas, no disponen del conjunto de nodos y haces que sincronicen la contracción del miocardio. Como ya se ha mencionado con anterioridad, en los amniotas se observa un tejido fibroso-graso en la región atrioventricular y no un miocardio en continuidad con los adyacentes, como en el caso de los condriictios ([Jensen et al., 2012](#)). Este tejido fibroso-graso causa el aislamiento de tipo eléctrico en la región atrioventricular del corazón de amniotas, lo que permite que la señal eléctrica que dispara la contracción de cada segmento se enlentezca y, por lo tanto, favorezca la sincronización entre ellos. Este carácter parece ser derivado dentro de los gnatostomados, lo que plantea la cuestión de cuál es el mecanismo responsable de la sincronización de la contracción cardiaca en los condriictios y, por lo tanto, en el hipotético corazón primitivo de los gnatostomados. Los resultados mostrados en el capítulo V sugieren que esto sería posible mediante una sincronización a nivel molecular de la contracción atrial y ventricular a través de la distribución diferencial de isoformas de MyHC. Por lo tanto, la propagación del impulso cardiaco no quedaría mediada por el retardo de una señal eléctrica en el sistema de conducción, sino por las diferencias en la velocidad de contracción (V_{max}) de las MyHC en la región

atrioventricular. Esto sería posible gracias al patrón de distribución diferencial de isomiosinas en la región atrioventricular de los condricios. La región más cercana al miocardio atrial compartiría el mismo tipo de contracción que el atrio debido a que abundarían las isomiosinas rápidas como MYH2 y MYH6. En la región ventricular se esperaría encontrar una mayor abundancia de isomiosinas lentas como MYH7 y MYH7B, consiguiendo una contracción acoplada con la del ventrículo. Esta sincronización de la contracción cardiaca ha sido sugerida (Moorman y Lamers, 1994) en corazones tubulares de embriones tempranos de amniotas que carecen de un sistema de conducción desarrollado. El corazón embrionario se vale de la distribución heterogénea de isomiosinas para conseguir una contracción no uniforme, pero sincronizada a lo largo del tubo cardiaco. A este respecto resulta especialmente interesante la estrecha relación que existe entre algunas isoformas de MyHC, como es el caso de MYH2, y el sistema de conducción cardiaco en desarrollo en corazones de amniotas. En concreto, MYH2 presenta una expresión única en los miocardiocitos en desarrollo localizados en los haces en formación en embriones de mamífero (Machida et al., 2002). Por lo tanto, se precisan análisis proteómicos para desvelar la diversidad del miosinoma cardiaco en otras especies sin un “sistema de conducción cardiaco morfológico” (p. ej., anfibios). De la misma forma, sería necesario conocer la localización de estas isoformas de MyHC, ya sea mediante técnicas inmunohistoquímicas o *MALDI imaging*, durante el desarrollo cardiaco.

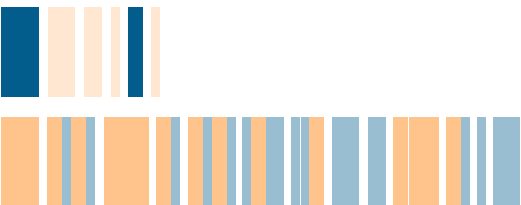


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo VIII

Conclusiones

Conclusions





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones

1. Las observaciones realizadas en corazones de diversas especies de holocéfalos indican que, en los vertebrados, a diferencia de lo considerado hasta la fecha, puede existir un sistema arterial coronario conspicuo en un ventrículo cardiaco carente de una capa de miocardio compacto. Este resultado refuerza la hipótesis de que el desarrollo del sistema arterial coronario y la proliferación del miocardio compacto obedecen a dos programas ontogenéticos diferentes, pero estrechamente relacionados.

2. Los resultados expuestos, en consonancia con los datos publicados en la bibliografía, apoyan la hipótesis evolutiva de que la condición primitiva de la mioarquitectura ventricular en los gnatostomados es el miocardio de tipo mixto y que, por lo tanto, las mioarquitecturas trabeculada y compacta deben considerarse condiciones derivadas.

3. El análisis del miosinoma cardiaco de individuos adultos de un representante de los elasmobranquios, la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), confirma que la mayor abundancia de isoformas rápidas de cadena pesada de miosina se da en los segmentos de la región cardiaca de entrada. De igual forma, la elevada concentración de isoformas lentas tiene lugar en la región cardiaca de salida. Esta distribución, observada en otros grupos como teleósteos, anfibios, aves o mamíferos, se interpreta como una sinapomorfía de los gnatostomados.

4. En el corazón de pintarroja se expresan, adicionalmente a las isoformas convencionales de cadena pesada de miosina cardiacas (MYH6 y MYH7), dos isomiosinas no identificadas con anterioridad en el corazón de otros vertebrados: MYH2 y MYH7B. Estos resultados sugieren que el corazón primitivo de los gnatostomados disponía de estas cuatro isoformas y que tanto MYH2 como MYH7B perdieron su función contráctil en el corazón antes de la divergencia entre los condictios y los osteíctios.

5. Nuestros resultados sugieren que MYH7B es una isoforma de cadena pesada de miosina lenta y tónica que facilita la contracción de tipo “peristaltóide” del cono arterioso en animales con un diseño cardiaco lineal.

6. El miocardio atrioventricular de la pintarroja está constituido por dos porciones, atrial y ventricular, distinguibles por su composición en isoformas de cadena pesada de miosina. Proponemos que, en ausencia de un sistema de conducción cardíaca especializado, esta distribución heterogénea de isomiosinas juega un papel en la sincronización del ciclo de contracción cardíaca.

7. El desarrollo de las trabéculas miocárdicas del ventrículo de la pintarroja, que posee un miocardio ventricular de tipo mixto, ocurre en tres fases: emergencia, trabeculación y remodelado. Al igual que en los miocardios ventriculares compactos de aves y mamíferos, la emergencia en el miocardio mixto tiene lugar mediante un proceso de invasión de las células endocárdicas hacia el miocardio en desarrollo. Este proceso difiere del descrito en el modelo de teleosteo con miocardio ventricular trabeculado, donde se produce por una delaminación activa de los miocardiocitos hacia el lumen. Estos resultados sugieren que el mecanismo de trabeculación miocárdica se ha conservado desde los condictios hasta los tetrápodos y que en los teleosteos se ha instaurado un proceso derivado.

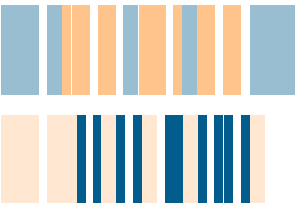
Conclusions

1. In the heart of different holocephalan species, a conspicuous coronary artery system exist in a cardiac ventricle lacking a compact myocardial layer. This result reinforces the hypothesis that the development of the coronary artery system and the proliferation of the compact myocardium result from two different, but closely related, developmental programs.
2. The present results confirm the evolutionary hypothesis that the primitive condition of the ventricular myoarchitecture in gnathostomes is the mixed-type myocardium. Therefore, trabeculated and compact myocardia should be considered derived conditions.
3. The analysis of the adult cardiac myosinome of an elasmobranch representative, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*), confirms that there is a high abundance of fast myosin heavy chain isoforms in segments of the cardiac inflow region and of slow isoforms in segments of the cardiac outflow region. This distribution, which has been observed in other groups such as teleosts, amphibians, birds and mammals, is interpreted as a synapomorphy of gnathostomes.
4. In addition to the conventional cardiac myosin heavy chain isoforms MYH6 and MYH7, the dogfish heart expresses two isomyosins not previously identified in the heart of other vertebrates: MYH2 and MYH7B. These results suggest that the primitive heart of gnathostomes had these four isoforms, and that both MYH2 and MYH7B lost their contractile function in the heart before the divergence between chondrichthyans and osteichthyans.
5. Our results suggest that MYH7B is a slow and tonic myosin heavy chain isoform that facilitates “peristaltoid” contraction of the conus arteriosus in animals with a non-septate heart.
6. The atrioventricular myocardium of the dogfish consists of two portions, atrial and ventricular, which are distinguishable by their distinct myosin heavy chain isoform composition. We propose that, in the absence of a specialized cardiac

conduction system, this heterogeneous distribution of isomyosins plays a role in synchronizing the cardiac contraction cycle.

7. The development of the myocardial trabeculae of the dogfish ventricle occurs in three phases: emergence, trabeculation and remodeling. Similar to the compact ventricular myocardium of birds and mammals, the emergence in a mixed-type myocardium consists in the invasion of endocardial cells into the developing myocardium. This process differs from that described in the teleost model with trabeculated ventricular myocardium, which takes place by active delamination of the cardiomyocytes towards the lumen. These results suggest that the mechanism of myocardial trabeculation has been preserved from chondrichthyans to tetrapods, whereas the process in teleosts must be considered a derived trait.

Bibliografía





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Aanhaanen WT, Mommersteeg MT, Norden J, Wakker V, de Gier-de Vries C, Anderson RH, Kispert A, Moorman AFM, Christoffels VM. 2010. Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart. *Circ Res* 107: 728–736.
- Agnisola C, Tota B. 1994. Structure and function of the fish cardiac ventricle: flexibility and limitations. *Cardioscience* 5 (3): 145-153.
- Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. 2002. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1446–H1454.
- Aho E, Vornanen M. 1999. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. *J Exp Biol* 202: 2663-2677.
- Babu CJ, Warshaw DM, Periasamy M. 2000. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsp Res Tech* 50: 532-540.
- Bader D, Masaki T, Fischman DA. 1982. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Biol* 96: 763–770.
- Bakkers J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 91: 279–288
- Ballard WW, Mellinger J, Lechenault H. 1993. A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *J Exp Zool* 267(3): 318–336.
- Beffagna, G. 2019. Zebrafish as a smart model to understand regeneration after heart injury: how fish could help humans. *Front Cardiovasc Med* 6: 107.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Durán AC, Rodríguez C, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J. 2012. Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 220: 318–335.

- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Durán AC, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J. 2013. Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223: 171-184.
- Bell ML, Buvoli M, Leinwand LA. 2010. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol Cell Biol* 30(8):1937–1945.
- Berdougo E, Coleman H, Lee DH, Stainier DYR, Yelon D. 2003. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* 130 (24): 6121–6129.
- Bisaha JG, Bader D. 1991. Identification and characterization of a ventricular specific avian myosin heavy chain, VMYHC1: Expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol* 148: 355–364.
- Blair JE, Hedges SB. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol Biol Evol* 22: 2275–2284.
- Bugge J. 1961. The heart of the African lungfish, *Protopterus*. *Videnskabelige Meddelelserfra Dansk naturhistorisk Forening i Kjøbenhavn* 123: 193-210.
- Burggren W, Farrell A, Lillywhite H. 2010. Vertebrate Cardiovascular Systems. Nueva Jersey, EEUU: John Wiley & Sons, Inc.
- Briggs MM, Schachat F. 2002. The superfast extraocular myosin (MYH13) is localized to the innervation zone in both the global and orbital layers of rabbit extraocular muscle. *J Exp Biol* 205 (20): 3133-3142.
- Broughton RE, Betancur-R R, Li C, Arratia G, Ortí G. 2013. Multi-locus phylogenetic analysis reveals the pattern and tempo of bony fish evolution. *PLoS Currents* 5.
- Carroll RL. 1988. Vertebrate Paleontology and Evolution. Nueva York, EEUU: Freeman.

- Cerra MC, Amelio D, Tavolaro P, Palma A, Marciano V, Farina F. 2003. Pericardium of the frog, *Rana esculenta*, is morphologically designed as a lymphatic space. *J Morph* 257 (19): 72-77.
- Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AFM. 2010. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res* 106: 240-254.
- D'Amato G, Luxán G, Del Monte-Nieto G, Martínez-Poveda B, Torroja C, Walter W, Bochter MS, Benedito R, Cole S, Martínez F, Hadjantonakis AK, Uemura A, Jiménez-Borreguero LJ, De la Pompa JL. 2015. Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nature Cell Biol* 18 (1): 7-19.
- Dan-Goor M, Silberstein L, Kessel M, Muhlrad A. 1990. Localization of epitopes and functional effects of two novel monoclonal antibodies against skeletal muscle myosin. *J Mus Res Cell Mot* 11 (3): 216-226.
- Daniel JF. 1934. The Elasmobranch Fishes. Berkeley, EEUU: University of California.
- Davie PS, Farrell AP. 1991. The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. *Can J Zool* 69: 1993-2001.
- Davis CL. 1924. The cardiac jelly of the chick embryo. *Anat Rec* 27: 201-202.
- Debiais-Thibaud M, Chiori R, Enault S, Oulion S, Germon I, Martinand-Mari C, Casane D, Borday-Birraux V. 2015. Tooth and scale morphogenesis in shark: an alternative process to the mammalian enamel knot system. *BMC Evol Biol* 15: 292.
- De Groot IJM, Lammers WH, Moorman AFM. 1989. Isomyosin expression patterns during rat heart morphogenesis: An immunohistochemical study. *Anat Rec* 224: 365-373.
- De Jong F, Geerts WJC, Lamers WH, Los JA, Moorman AFM. 1990. Isomyosin expression pattern during formation of the tubular chicken heart: A three-dimensional immunohistochemical analysis. *Anat Rec* 226: 213-227.
- Del Monte-Nieto G, Ramialison M, Adam AA, Wu B, Aharonov A, D'uva G, Bourke LM, Pitulescu ME, Chen H, De la Pompa JL, Shou W, Adams

- RH, Harten SK, Tzahor E, Zhou B, Harvey RH. 2018. Control of cardiac jelly dynamics by NOTCH1 and NRG1 defines the building plan for trabeculation. *Nature*, 557 (7705): 439-445.
- Desjardins PR, Burkman JM, Shrager JB, Allmond LA, Stedman HH. 2002. Evolutionary implications of three novel members of the human sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Mol Biol Evol* 19 (4): 375–393.
- Domingues HS, Wang H, Macedo-Ribeiro S, Urbanski MM, Relvas JB, Rubinstein B, Melendez-Vasquez CV, Pinto IM. 2020. Synchronization and spatial patterning of myosin motors regulates oligodendrocyte differentiation speed. *iScience (En prensa, DOI: 10.2139/ssrn.3316806)*.
- Durán AC, Fernández B, Grimes AC, Rodríguez C, Arqué JM, Sans-Coma V. 2008. Chondrichthyans have a bulbus arteriosus at the arterial pole of the heart: morphological and evolutionary implications. *J Anat* 213: 597-606.
- Durán AC, López-Unzu MA, Rodríguez C, Fernández B, Lorenzale M, Linares A, Salmerón F, Sans-Coma V. 2015. Structure and vascularization of the ventricular myocardium in Holocephali: their evolutionary significance. *J Anat* 226 (6): 501-510.
- England J, Loughna S. 2013. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. *Cell Mol Life Sci* 70: 1221–1239.
- England J, Loughna S. 2018. Vertebrate Embryo: An overview of heart development and the utilization of multiple animal models in research. En: *Encyclopedia of life sciences*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Farah CS, Reinach FC. 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* 9 (9): 755-767.
- Farmer C. 1997. Did lungs and the intracardiac shunt evolve to oxygenate the heart in vertebrates? *Paleobio* 23 (3): 358-372.
- Farmer C. 1999. Evolution of the vertebrate cardio-pulmonary system. *Ann Rev Physiol* 61: 573-592.

- Farrell AP, Simonot DL, Seymour RS, Clark TD. 2007. A novel technique for estimating the compact myocardium in fishes reveals surprising results for an athletic air-breathing fish, the Pacific tarpon. *J Fish Biol* 71: 389-398.
- Farrell AP, Farrell ND, Jourdan H, Cox GK. 2012. A perspective on the evolution of the coronary circulation in fishes and the transition to terrestrial life. En: Sedmera D, Wang T (eds). *Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart*. Nueva York, EEUU: Springer. pp 75-102.
- Faure-Brac M, Cubo J. 2020. Were the synapsids primitively endotherms? A palaeohistological approach using phylogenetic eigenvector maps. *Phil Trans R Soc B* 375: 20190138.
- Franco D, Gallego A, Habets PE, Sans-Coma V, Moorman AFM. 2002. Species-specific differences of myosin content in the developing cardiac chambers of fish, birds, and mammals. *Anat Rec* 268 (1): 27-37.
- Fukuda R, Aharonov A, Ong YT, Stone OA, El-Brolosy M, Maischein HM, Potente M, Tzahor E, Stainier DYR. 2019. Metabolic modulation regulates cardiac wall morphogenesis in zebrafish. *eLife* 8: e50161.
- Garriock RJ, Meadows SM, Krieg PA. 2005. Developmental expression and comparative genomic analysis of *Xenopus* cardiac myosin heavy chain genes. *Dev Dyn* 233: 1287–1293.
- Giardoglou P, Beis D. 2019. On zebrafish disease models and matters of the heart. *Biomedicines* 7: 15.
- Grimes AC, Stadt HA, Shepard IT, Kirby ML. 2006. Solving an enigma: Arterial pole development in the zebrafish heart. *Dev Biol* 290: 265–276.
- Grimes AC, Kirby ML. 2009. The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *J Fish Biol* 74: 983-1036.
- Halpern MM, May MM. 1958. Phylogenetic study of the extracardiac arteries to the heart. *Am J Anat* 102: 469-480.
- Hu N, Sedmera D, Yost HJ, Clark EB. 2000. Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat Rec* 260: 148–157.

- Hughes LC, Ortia G, Huang Y, Sun Y, Baldwin CC, Thompson AW, Arcila D, Betancour RR, Lig C, Beker L, Bellora N, Zhao X, Lic X, Wank M, Gang C. 2018. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 6249-6254.
- Icardo JM, Colvee E, Cerra MC, Tota B. 1999. Bulbus arteriosus of the antarctic teleosts. I. The white-blooded *Chionodraco hamatus*. *Anat Rec* 254: 396–407.
- Icardo JM, Guerrero A, Durán AC, Domezain A, Colvee E, Sans-Coma V. 2004. The development of the sturgeon heart. *Anat Embryol* 208: 439–449.
- Icardo JM, Ojeda JL, Colvee E, Tota B, Wong WP, Ip YK. 2005. Heart inflow tract of the African lungfish *Protopterus dolloi*. *J Morphol* 2005 263(1): 30-38.
- Icardo JM, Guerrero A, Durán AC, Colvee E, Domezain A, Sans-Coma V. 2009. The development of the epicardium in the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Anat Rec* 292 (10): 1593-1601.
- Icardo JM, Colvee E. 2011. The atrioventricular region of the teleost heart. A distinct heart segment. *Anat Rec* 294: 236-242.
- Icardo JM; Fernández-Terán A. 1987. Morphologic study of ventricular trabeculation in the embryonic chick heart. *Acta Anat* 130: 264–274.
- Inoue JG, Miya M, Lam K, Tay BH, Danks JA, Bell J, Walker TI, Venkatesh B. 2010. Evolutionary origin and phylogeny of the modern holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): A mitogenomic perspective. *Mol Biol Evol* 27 (11): 2576-2586.
- Ivanovitch K, Esteban I, Torres M. 2007. Growth and morphogenesis during early heart development in amniotes. *J Cardiovasc Dev Dis* 4: 20.
- Jensen B, Boukens BJD, Postma AV, Gunst QD, van den Hoff MJB, Moorman AFM, Wang T, Christoffels VM. 2012. Identifying the evolutionary building blocks of the cardiac conduction system. *PLoS ONE* 7(9): e44231.

- Jensen B, Wang T, Christoffels VM, Moorman AFM. 2013. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Bioch Biophys Acta* 1833: 783–794.
- Jensen B, Boukens BJD, Wang T, Moorman AFM, Christoffels VM. 2014. Evolution of the sinus venosus from fish to human. *J Cardiovasc Dev Dis* 1: 14-28.
- Jensen B, Smit T. 2018. Examples of weak, if not absent, form-function relations in the vertebrate heart. *J Cardiovasc Dev Dis* 5 (3): 46.
- Johansen K, Burggren WW. 1980. Cardiovascular function in the lower vertebrates. in hearts and heartlike organs. En: Bourne GH (ed). Comparative anatomy and development. Nueva York, EEUU: Academic Press. pp 61-117.
- Keith A. 1924. Fate of the bulbus cordis in human heart. *The Lancet* 204 (5286): 1267-1273.
- Koibuchi N, Chin MT. 2007. CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression. *Circ Res* 100: 850-855.
- Kroneman JGH, Faber JW, Shouten JCM, Wolschrijn CF, Christoffels VM, Jensen B. 2018. Comparative analysis of avian hearts provides little evidence for variation among species with acquired endothermy. *J Morphol* 280: 395–410.
- Kruithof BPT, Kruithof-de-Julio M, Poelmann RE, Gittenberger-de-Groot AC, Gaussin V, Goumans MJ. 2013. Remodeling of the myocardium in early trabeculation and cardiac valve formation; a role for TGFβ2. *Int J Dev Biol* 57: 853-863.
- Machida S, Noda S, Takao A, Nakazawa M, Matsuoka R. 2002. Expression of slow skeletal myosin heavy chain 2 gene in Purkinje fiber cells in chick heart. *Biol Cell* 94 (6): 389–399.
- Mackinnon MR, Heatwole H. 1981. Comparative cardiac anatomy of the Reptilia. IV. The coronary arterial circulation. *J Morphol* 170: 1-27.

- Maldanis L, Carvalho M, Almeida, Freitas FI, Andrade JAFG, Nunes R, Rochitte CR, Poppi RJ, Freitas RO, Rodrigues F, Siljeström S, Lima AL, Galante D, Carvalho IS, Perez CA, Carvalho BJ, Fernández V, Xavier-Neto J. 2016. Heart fossilization is possible and informs the evolution of cardiac outflow tract in vertebrates. *eLife Ecol Evol Biol* 5: e14698.
- Margossian SS, Lowey S. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 85(B): 55-71.
- Martin H. 1893. Note sur l'existence des vaisseaux nourriciers du muscle cardiaque chez la grenouille. *C R Soc Biol* 5: 754-756.
- Mascarello F, Toniolo L, Cancellara P, Reggiani C, Maccatrozzo L. 2009. Expression and identification of 10 sarcomeric MyHC isoforms in human skeletal muscles of different embryological origin. Diversity and similarity in mammalian species. *Ann Anat* 207: 9–20.
- Meyer A, Zardoya R. 2003. Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Ann Rev Eco Sys* 34: 311-338.
- Moore LA, Tidyman WE, Arrizubieta MJ, Bandman E. 1992. Gene conversions within the skeletal myosin multigene family. *J Mol Biol* 223: 368–387.
- Moorman AFM, Lamers WH. 1994. Molecular anatomy of the developing heart. *Trend Cardiovasc Med* 4: 257–264.
- Moriyama Y, Ito F, Takeda H, Yanos T, Okabe M, Kuraku S, Keeley FW, Koshiba-Takeuchi K. 2016. Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. *Nature Comm* 19 (7): 10397.
- Morkin, E. 2000. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Micro Res Tech* 50: 522–531.
- Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, De Andrés V, Gallego A, Navarro P. 1994. Cardiac development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): A model for the study of vertebrate cardiogenesis. *Cardioscience* 5 (4): 245-253.

- Muñoz-Chápuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Pérez-Pomares JM. 2002. The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development. *Rev Esp Cardiol* 55 (10): 1070-1082.
- Naylor GJ, Caira JN, Jensen K, Rosana KA, Straube N, Lakner C. 2012. Elasmobranch phylogeny: a mitochondrial estimate based on 595 species. En: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (eds). *The biology of sharks and their relatives*. Florida, EEUU: CRC Press. pp 31-56.
- Nelson OL, Rourke BC. 2013. Increase in cardiac myosin heavy-chain (MyHC) alpha protein isoform in hibernating ground squirrels, with echocardiographic visualization of ventricular wall hypertrophy and prolonged contraction. *FASEB J* 216: 4678-4690.
- Nikitina LV, Kopylova GV, Shchepkin DV, Nabiev SR, Bershtsky SY. 2015. Investigations of molecular mechanisms of actin–myosin interactions in cardiac muscle. *Biochemistry* 80 (13): 1748-1763.
- Noak K, Zardoya R, Meyer A. 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order. *Genetics* 144: 1165–1180.
- Lamers WH, Geerts WJC, Moorman AFM. 1990. Distribution pattern of acetylcholinesterase in early embryonic chicken hearts. *Anat Rec* 228: 297-305.
- Lavine KJ, Schmid GJ, Smith GS, Ornitz DM. 2008. Novel tool to suppress cell proliferation in vivo demonstrates that myocardial and coronary vascular growth represent distinct developmental programs. *Dev Dyn* 237: 713-724.
- Lee L, Karabina A, Broadwell LJ, Leinwand LA. 2019. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skel Mus* 9(1): 1-15.
- Liu J, Bressan M, Hassel D, Huisken J, Staudt D, Kikuchi K, Poss KD, Mikawa T, Stainier DYR. 2010. A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation. *Development* 137: 3867–3875.

- Lloyd-Evans P. 1993. Development of the lymphomyeloid system in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Dev Comp Immuno* 17: 501-514.
- López-Unzu MA, Durán AC, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2019. Differential expression of myosin heavy chain isoforms in cardiac segments of gnathostome vertebrates and its evolutionary implications. *Front Zool* 16 (1): 1-15.
- López-Unzu MA, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC. 2020a. Myosin heavy chain isoforms in the myocardium of the atrioventricular junction of *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Carcharhiniformes). *J Fish Biol* 97 (3): 734–739.
- López-Unzu MA, Durán AC, Rodríguez C, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2020b. Development of the ventricular myocardial trabeculae in *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes): Evolutionary implications. *Sci Rep* 10 (1): 14434.
- Lorenzale M, López-Unzu MA, Fernández MC, Durán AC, Fernández B, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V. 2017. Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterization of the cardiac outflow tract of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes). *Zoology* 120: 15-23.
- Lorenzale M, López-Unzu MA, Rodríguez C, Fernández B, Durán AC, Sans-Coma V. 2018a. The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians. *Biol Rev* 93 (3): 1604-1619.
- Lorenzale M, Fernández B, Durán AC, López-Unzu MA, Sans-Coma V. 2018b. The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes): Anatomical, histological and evolutionary aspects. *Anat Histol Embryol* 2018: 1–6.
- O'Neill PO, McCole RB, Baker CVH. 2007. A molecular analysis of neurogenic placode and cranial sensory ganglion development in the shark, *Scyliorhinus canicula*. *Dev Biol* 304: 156-181.

- Ostadal B, Rychter Z, Poupa O. 1970. Comparative aspects of the development of the terminal vascular bed in the myocardium. *Physiologia bohemoslovaca* 19: 1-7.
- Pecci A, Ma X, Savoia A, Adelstein RS. 2019. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin iia in human disease. *Gene* 664: 152–167.
- Pérez-Pomares JM, González-Rosa JM, Muñoz-Chápuli R. 2009. Building the vertebrate heart - an evolutionary approach to cardiac development. *Int J Dev Biol* 53: 1427-1443.
- Peshkovsky C, Totong R, Yelon D. 2011. Dependence of cardiac trabeculation on neuregulin signaling and blood flow in zebrafish. *Dev Dyn* 240: 446–456.
- Peter AK, Rossi AC, Buvoli M, Ozeroff CD, Crocini C, Perry AR, Buvoli AE, Lee LA, Leinwand LA. 2019. Expression of normally repressed myosin heavy chain 7b in the mammalian heart induces dilated cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* 8: e013318.
- Picard B, Barborion C, Chadeyron D, Jurie C. 2011. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* 32 (14): 1804-1806.
- Ramos C, Muñoz-Chápuli R, Navarro P. 1996. Ultrastructural study of the myocardium of the sinus venosus and sinoatrial valve in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *J Zoo* 238(4): 611-621.
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261 (5117): 50-58.
- Rasmussen AS, Arnason U. 1999a. Molecular studies suggest that cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2177-2182.

- Rasmussen AS, Arnason U. 1999b. Phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA molecules place cartilaginous fishes within the tree of bony fishes. *J Mol Evol* 48(1): 118-123.
- Reiser PJ, Kliner WO. 1998. Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 274 (3): H1048-H1053.
- Ridge LA, Mitchell K, Al-Anbaki A, Shaikh Qureshi WM, Stephen LA, Tenin G, Lu Y, Lupu IE, Clowes C, Robertson A, Barnes E, Wright JA, Keavney B, Ehler E, Lovell SC, Kadler KE, Hentges KE. 2017. Non-muscle myosin IIB (Myh10) is required for epicardial function and coronary vessel formation during mammalian development. *PLoS Genet* 13 (10): e1007068.
- Risal D, Gourinath S, Himmel DM, Szent-Györgyi AG, Cohen C. 2004. Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *PNAS* 101(24): 8930-8935.
- Rodríguez C, Sans-Coma V, Grimes AC, Fernández B, Arqué JM, Durán AC. 2013. Embryonic development of the bulbus arteriosus of the primitive heart of jawed vertebrates. *Zool Anz* 252: 359-366.
- Rodríguez C, Lorenzale M, López-Unzu MA, Fernández B, Salmerón F, Sans-Coma V, Durán AC. 2017. The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance. *Zoology* 123: 37-45.
- Romenskii O. 1978. Blood supply of the compact and spongy myocardium of fish, amphibia and reptiles. *Arkh Anat Gistol Embriol* 75 (7): 91-95.
- Rossi AC, Mammucari C, Argentini C, Reggiani C, Schiaffino S. 2010. Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles. *J Physiol* 588 (2): 353–364.

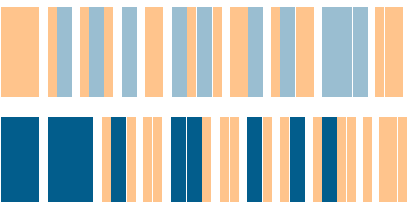
- Samsa LA, Yang B, Liu J. 2013. Embryonic cardiac chamber maturation: trabeculation, conduction and cardiomyocyte proliferation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163 (3): 157–168.
- Samsa LA, Givens C, Tzima E, Stainier DYR, Qian Li, Liu J. 2015. Cardiac contraction activates endocardial Notch signaling to modulate chamber maturation in zebrafish. *Development* 142: 4080-4091.
- Santer RM, Cobb JLS. 1972. The fine structure of the heart of the teleost, *Pleuronectes platessa* L. *Z Zellforsch* 131: 1-14.
- Santer RM. 1985. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 89: 1-102.
- Santer RM, Greer Walker M. 1980. Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. *J Zool London* 190: 259-272.
- Satchell GH, Jones MP. 1967. The function of the conus arteriosus in the port jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *J Exp Biol* 46: 373-382.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447–1531.
- Schiaffino S, Reggiani C, Kostrominova TY, Mann M, Murgia M. 2015. Mitochondrial specialization revealed by single muscle fiber proteomics: focus on the Krebs cycle. *Scand J Med Sci Sports* 25 (Suppl. 4): 41–48.
- Schib JL, Icardo M, Durán AC, Guerrero A, López A, Colvee E, De Andrés AV, Sans-Coma V. 2002. The conus arteriosus of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). *J Anat* 201: 395-404.
- Schlueter J, Brand T. 2013. Subpopulation of proepicardial cells is derived from the somatic mesoderm in the chick embryo. *Circ Res* 113(10):1128-1137.
- Sedmera D, Pexieder T, Hu N, Clark EB. 1997. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *Anat Rec* 248:421–432.
- Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. 2000. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec* 248: 319-337.

- Sedmera D. 2011. Function and form in the developing cardiovascular system. *Car Res* 91: 252–259.
- Sedmera D, Ostadal B. 2012. Ontogenesis of myocardial function. En: Sedmera D, Wang T (eds). *Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart*. Nueva York: Springer. pp 147-175
- Sellers JR. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochem Biophys Act* 1496: 3-22.
- Simoës-Costa MS, Vasconcelosa M, Sampaioa AC, Cravoia RM, Linharesa VL, Hochgreba T, Yanb CYI, Davidsonc B, Xavier-Neto J. 2005. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol* 277: 1–15.
- Simonot DL. (2005). Cardiac remodeling in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). MSc thesis, University of British Columbia, Vancouver.
- Somi S, Klein ATJ, Houweling AC, Ruijter JM, Buffing AAM, Moorman AFM, Van den Hoff MJB. 2006. Atrial and ventricular myosin heavy-chain expression in the developing chicken heart: strengths and limitations of non-radioactive *In Situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 54 (6): 649–664.
- Stainier DYR, Fishman MC. 1992. Patterning the zebrafish heart tube acquisition of anteroposterior polarity. *Dev Biol* 153: 91–101.
- Staudt DW, Liu J, Thorn KS, Stuurman N, Liebling M, Stainier DYR. 2014. High-resolution imaging of cardiomyocyte behavior reveals two distinct steps in ventricular trabeculation. *Development* 141: 585-593.
- Stoyek MR, Croll RP, Smith FM. 2015. Intrinsic and extrinsic innervation of the heart in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 523: 1683–1700.
- Sudak FN. 1965. Intrapericardial and intracardiac pressures and the events of the cardiac cycle in *Mustelus canis* (Mitchill). *Comp Biochem Physiol* 14(4): 689–705
- Taber LA. 2006. Biophysical mechanisms of cardiac looping. *Int J Dev Biol* 50: 323–332.

- Takeaki N, Figueroa F, Zaleska-Rutczynska Z, Klein J. 2003. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol Biol Evol* 20: 287-292.
- Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. 2009. The genus *Polypterus* (bichirs): a fish group diverged at the stem of ray-finned fishes (Actinopterygii). En: Crotty DA, Gann A (eds). *Emerging model organisms: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 447-467.
- Tota B, Cimini V, Salvatore G, Zummo G. 1983. Comparative study of the arterial and lacunary system of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. *Am J Anat* 167: 15-32.
- Tota B. 1989. Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. *J Exp Zool Suppl* 2: 122-135.
- Uribe V, Ramadass R, Dogra D, Rasouli SJ, Gunawan F, Nakajima H, Chiba A, Reischauer S, Mochizuki N, Stainier DYR. 2018. *In vivo* analysis of cardiomyocyte proliferation during trabeculation. *Development* 145: dev16419.
- Venkatesh B, Ning Y, Brenner S. 1999. Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10267-10271.
- Venkatesh B, Lee AP, Ravi V, Maurya AK, Lian MM, Swann JB, Ohta Y, Flajnik MF, Sutoh Y, Kasahara M, Hoon S, Gangu V, Roy SW, Irimia V, Korzh M, Kondrychyn I, Lim ZW, Tay BH, Tohari S, Kong KW, Ho S, Lorente-Galdos B, Quilez J, Marques-Bonet T, Raney BJ, Ingham PW, Tay A, Hillier LW, Minx P, Boehm T, Wilson RK, Brenner S, Warren WC. 2014. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* 505: 174-179.
- Vornanen M. 1994. Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts. *AJP Regul Integrat Comp Physiol* 267 (6): R1567-R1573.

- Wang X, Ono Y, Tan SC, Chai RJ, Parkin C, Ingham PW. 2011. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development* 138(20): 4399–4404.
- Warkman AS, Whitman SA, Miller MK, Garriock RJ, Schwach CM, Gregorio CC, Krieg PA. 2012. Developmental expression and cardiac transcriptional regulation of myh7b, a third myosin heavy chain in the vertebrate heart. *Cytoskeleton* 69: 324–335.
- Wessels A, Vermeulen JL, Virágh S, Kálmán F, Morris GE, Man NT, Lamers WH, Moorman AFM. 1996. Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. I. An immunohistochemical analysis of creatine kinase isoenzyme expression patterns. *Anat Rec* 228 (2): 163-176.
- Yamauchi A. 1980. Fine structure of the fish heart. En: Bourne GH (ed). Hearts and heart-like organs. Nueva York, EEUU: Academic Press. pp 111-149.
- Yelon D, Horne SA, Stainier DYR. 1999. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol* 214: 23–37.
- Yuztey KE, Rhee JT, Bader D. 1994. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 120: 871-883.
- Zardoya R, Meyer A. 2001. Vertebrate phylogeny: limits of inference of mitochondrial genome and nuclear rDNA sequence data due to an adverse phylogenetic signal/noise ratio. En: Ahlberg PE (ed). Major events in early vertebrate evolution, paleontology, phylogeny, genetics and development. Londres, Reino Unido: Taylor and Francis, pp 106-118.
- Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MAPK, Weinstein B, Fishman MC. 2000. *Gridlock*, an HLH Gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* 287: 1820-1823.
- Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. 2001. Gridlock signaling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 414: 216-220.

Artículos originales





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Publicaciones

López-Unzu MA, Durán AC, Rodríguez C, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2020b. Development of the ventricular myocardial trabeculae in *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes): Evolutionary implications. *Scientific Reports* 10 (1): 14434.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71318-x>.

López-Unzu MA, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC. 2020a. Myosin heavy chain isoforms in the myocardium of the atrioventricular junction of *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Carcharhiniformes). *Journal of Fish Biology* 97 (3): 734–739.

DOI: <https://doi.org/10.1111/jfb.14427>.

López-Unzu MA, Durán AC, Soto-Navarrete MT, Sans-Coma V, Fernández B. 2019. Differential expression of myosin heavy chain isoforms in cardiac segments of gnathostome vertebrates and its evolutionary implications. *Frontiers in Zoology* 16 (1): 1-15.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0318-9>.

Durán AC, López-Unzu MA, Rodríguez C, Fernández B, Lorenzale M, Linares A, Salmerón F, Sans-Coma V. 2015. Structure and vascularization of the ventricular myocardium in Holocephali: their evolutionary significance. *Journal of Anatomy* 226 (6): 501-510.

DOI: <https://doi.org/10.1111/joa.12317>.