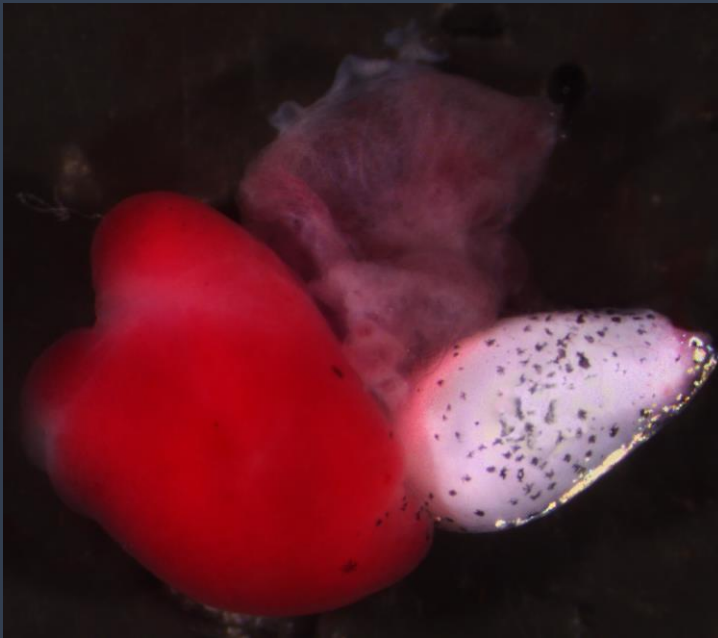




FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL
PROGRAMA DE DOCTORADO:
DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE

TESIS DOCTORAL

EL TRACTO DE SALIDA DEL CORAZÓN DE LOS
CONDRICTIOS Y ACTINOPTERIGIOS



Miguel Lorenzale García
2019

DIRECTORES
Francisco de Borja Fernández Corujo
Valentín Sans Coma



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Animal

TESIS DOCTORAL:

EL TRACTO DE SALIDA DEL CORAZÓN DE LOS CONDRICTIOS Y ACTINOPTERIGIOS

Presentado por Don Miguel Lorenzale García Para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Málaga

Directores:

Prof. Dr. Valentín Sans Coma

Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo

Tutor:


Prof. Dr. Francisco de Borja Fernández Corujo





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miguel Lorenzale García

 <http://orcid.org/0000-0002-2790-5585>

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

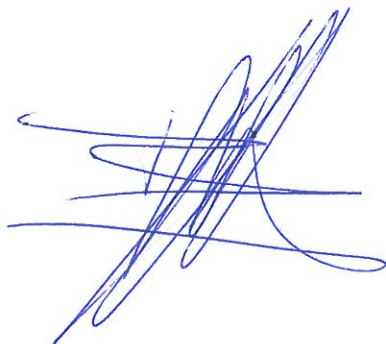


Los Doctores Borja Fernández Corujo, Profesor Titular de Biología Animal, y Valentín Sans Coma, Catedrático de Zoología, ambos de la Universidad de Málaga,

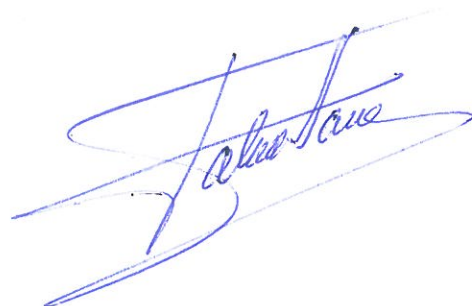
acreditan que Don Miguel Lorenzale García, Graduado en Biología por la Universidad de Málaga, ha llevado a cabo las investigaciones que le han conducido a la redacción de la presente memoria de tesis para aspirar al grado de Doctor en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. La memoria se titula El Tracto de Salida del Corazón de los Condrictios y Actinoptergios.

En calidad de Directores de los estudios realizados por el aspirante, los abajo firmantes consideran que la memoria reúne todos los requisitos para ser presentada como tesis por compendio de publicaciones. Asimismo, afirman que tales publicaciones no se han utilizado en tesis doctorales precedentes. Por ello, consideran que la memoria puede someterse a juicio de la comisión que corresponda y autorizan su exposición y defensa para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, según normativa establecido en el Real Decreto 99/2011 y modificaciones posteriores de 2013, 2015 y 2016, que regulan las Enseñanzas de Doctorado, firman la presente autorización en Málaga, a 14 de Diciembre de 2018



Fdo: Dr. Borja Fernández Corujo
Director de la Tesis
Tutor del Doctorando



Fdo: Valentín Sans Coma
Director de la Tesis

INDICE



INDICE

I. Prefacio	7
1. Formato de la tesis	9
2. Aval y estructura de la tesis	9
3. Ámbito en el que se ha realizado la tesis	10
4. Soporte financiero de la tesis	11
5. Agradecimientos	11
II. Introducción	15
1. Unidad temática de las publicaciones que avalan la tesis	17
2. Nomenclatura y especies citadas en la tesis	17
2.1. Nomenclatura	17
2.2. Especies citadas en el texto	18
3. Antecedentes y objetivos de la tesis	19
3.1. Los sistemas circulatorios de los vertebrados gnatostomados	19
3.2. Las partes anatómicas del corazón de los vertebrados gnatostomados	21
3.3 El tracto de salida cardiaco de los condriictios y actinopterigios: sinopsis histórica	23
4. Siglo XIX	26
4.1. El bulbo arterioso como único componente del tracto de salida cardiaco de los peces	26
4.2. El concepto de cono arterioso según Gegenbaur	27
5. Siglo XX	28
5.1. Componentes del tracto de salida cardíaco en peces	28
5.2. El cono arterioso de los condriictios	28
5.3. El cono arterioso de los teleósteos	29
5.4. El bulbo arterioso de los teleósteos	30
5.5. El concepto de tracto de salida cardiaco según Parsons	31
6. Siglo XXI	32
6.1. El tracto de salida cardiaco en condriictios y actinopterigios antiguos	33
6.2. El tracto de salida cardiaco en teleósteos	36

7. Fundamentos de los objetivos de la tesis	37
III. Objetivos	43
IV. Resumen de las publicaciones en español	47
1. Publicación 1: The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians <i>Los componentes anatómicos del tracto de salida cardiaco de condrichtios y actinopterygios</i>	57
2. Publicación 2: The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance. <i>El bulbo arterioso del corazón de los holocefalos: anatomía macroscópica, histomorfología, pigmentación y significado evolutivo</i>	57
3. Publicación 3: The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, <i>Raja asterias</i> (Chondrichthyes; Rajiformes) <i>Las válvulas del tracto de salida cardiaco de la raya estrellada, Raja asterias (Chondrichthyes; Rajiformes)</i>	61
4. Publicación 4: Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (Teleostei: Osteoglossiformes) <i>Caracterización anatómica, histoquímica e inmunohistoquímica del tracto de salida cardíaco de la arawana plateada, Osteoglossum bicirrhosum (Teleostei: Osteoglossiformes)</i>	65
V. Conclusiones	71
VI. Bibliografía	75
VII. Artículos originales y comentarios de los revisores	89
1. The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians. Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Cristina Rodríguez, Borja Fernández, Ana C. Durán, Valentín Sans-Coma. <i>Biological Reviews</i> (2018) Aug;93(3):1604-1619	91
2. The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance. Cristina Rodríguez, Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Borja Fernández,	

Francisca Salmerón, Valentín Sans-Coma, Ana C. Durán. <i>Zoology</i> (2017), <i>123</i> : 37–45	137
3. The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, <i>Raja asterias</i> (Chondrichthyes; Rajiformes). Miguel Lorenzale, Borja Fernández, Ana C. Durán, Miguel A. López-Unzu, Valentín Sans-Coma. <i>Anatomia Histologia</i> <i>Embryologia</i> (2018) Oct 31. doi: 10.1111/ahe.12409	153
4. Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (Teleostei: Osteoglossiformes). Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, M. Carmen Fernández, Ana C. Durán, Borja Fernández, M. Teresa Soto- Navarrete, Valentín Sans-Coma. <i>Zoology</i> (2017), <i>120</i> : 15-23	163

I. PREFACIO



I. PREFACIO

1. Formato de la tesis

El formato de la presente memoria se ajusta al de tesis por compendio de publicaciones, es decir, está constituida por un conjunto de artículos publicados, firmados por el doctorando, que están directamente relacionados con el tema central de la tesis. Según la normativa vigente, este formato de tesis debe estar avalado por un mínimo de tres publicaciones, cuya suma de puntuaciones ha de ser igual o superior a 1 punto, según los criterios de la ANECA o los elaborados por las diferentes comisiones académicas de doctorado, siempre en cumplimiento con los criterios de la ANECA. Asimismo, la normativa establece que la memoria de tesis debe constar de una introducción, en la que se presenten los trabajos publicados y se justifique su unidad temática, un resumen de los resultados obtenidos, su discusión, si procede, las conclusiones y una copia de las publicaciones que integran tesis.

2. Aval y estructura de la tesis

La presente tesis está avalada por un total de cuatro publicaciones, de las que el que suscribe es el primer autor en tres de ellas y segundo en una, todas ellas incluidas en el *Journal of Citation Reports (JCR)*, una en la categoría temática de Biología, dos en la de Zoología y la restante en la de Veterinaria. Siguiendo los criterios de la ANECA, la puntuación total es de 3,75.

Atendiendo a lo establecido para las tesis por compendio de publicaciones, la memoria incluye (1) una introducción en la que se presentan los trabajos que la integran y se justifica su unidad temática, (2) la enumeración de los objetivos de la tesis, (3) un resumen de cada una de las publicaciones, en el cual constan los resultados obtenidos y su discusión, (4) las conclusiones principales derivadas del conjunto de investigaciones realizadas, (5) una copia de los artículos que conforman la tesis, cada uno de ellos acompañado de los comentarios del editor de la revista en cuestión y de los revisores del trabajo, así como las respuestas a dichos comentarios, y (6) una lista bibliográfica en la que figuran los trabajos citados en la exposición que precede a los artículos publicados.

3. Ámbito en el que se ha realizado la tesis

Los estudios que han conducido a la elaboración de la tesis se han efectuado en el seno del Grupo de Investigaciones Cardiovasculares en Vertebrados (Ref. BIO 203; Junta de Andalucía) del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. En dicho grupo, los estudios sobre el sistema cardiovascular de los vertebrados comenzaron, en 1984, en el marco de un proyecto de investigación multidisciplinario subvencionado por la C.A.I.C.Y.T (Proyecto 1416/82, Ministerio de Educación y Ciencia), en el que se incluía un estudio sobre las arterias coronarias de roedores de vida libre. Desde aquel año hasta la actualidad, el grupo ha dedicado una parte sustancial de sus investigaciones al corazón de los tetrápodos, en especial de los mamíferos. La morfología, la embriología, las malformaciones y la patogénesis de las arterias coronarias y de las válvulas arteriales han sido y son temas prioritarios.

Unos años después de iniciarse los estudios cardiovasculares en mamíferos se abrió una línea de investigación sobre el corazón de condrictios. Los primeros trabajos versaron sobre los patrones anatómicos de las arterias coronarias en diferentes órdenes de elasmobranquios (De Andrés et al., 1990, 1992) y la interpretación de dichos patrones desde la perspectiva filogenética (Muñoz-Chápuli et al., 1994a). Una investigación realizada en embriones de pintarroja, *Scyliorhinus canicula*, proporcionó datos sobre el desarrollo de las arterias coronarias y de las venas cardíacas en los condrictios (De Andrés et al., 1993) que constituyeron una primicia en su época. Un año más tarde, Muñoz-Chápuli et al. (1994b) publicaron un artículo en el que propusieron la pintarroja como modelo para estudiar la cardiogénesis en vertebrados. La especie, que ya se había empleado en trabajos sobre lesiones escleróticas en arterias coronarias de elasmobranquios adultos (Muñoz-Chápuli et al., 1991; García-Garrido et al., 1993), se utilizó también para el estudio de la anatomía, histología y formación de válvulas cardíacas (Sans-Coma et al., 1995; Gallego et al., 1997) y del desarrollo del epicardio (Muñoz-Chápuli et al., 1997).

En el Grupo de Estudios Cardiovasculares en Vertebrados, los estudios sobre el corazón de los “peces” se reiniciaron tras una pausa de aproximadamente un lustro, contando, en ocasiones, con la colaboración de investigadores externos. Siguiendo un orden cronológico, los temas que se abordaron se referían al corazón (1) de la dorada, *Sparus aurata*, (Schib et al., 2002; Icardo et al., 2003), (2) del esturión del Adriático, *Acipenser naccarii*, (Guerrero et al., 2004, 2007; Icardo et al., 2004; 2009a,b), (3) de

diversos grupos de condrictios (Durán et al., 2008, 2010, 2015; Rodríguez et al., 2013, 2016, 2017; Lorenzale et al. 2018a,b), (4) del bichir gris, *Polypterus senegalus*, (Durán et al., 2014; Reyes-Moya et al., 2015) y (5) de la arawana plateada, *Osteoglossum bicirrhosum*, (Lorenzale et al., 2017). Aparte de estos trabajos, hay que citar un estudio evolutivo sobre el tracto de salida cardíaco de condrictios y actinopterigios (Grimes et al., 2010), la descripción de un caso de dicefalia en embriones de olayo atlántico, *Galeus atlanticus*, (Sans-Coma et al., 2017) y una revisión histórica del tracto de salida cardíaco de condrictios y actinopterigios (Lorenzale et al., 2018a).

En concreto, los trabajos que avalan la presente tesis son los de Lorenzale et al. (2017, 2018a,b) y de Rodríguez et al. (2017). En este último, el doctorando figura como segundo autor.

4. Soporte financiero de la tesis

Los trabajos de investigación en los que se fundamenta la presente tesis han recibido soporte financiero a través de los proyectos CGL2010-16417 y CGL2014-52356-P (Ministerio de Economía y Competitividad, España, y fondos FEDER).

5. Agradecimientos

En el ámbito de la ciencia empírica es muy poco frecuente que alguien realice en solitario los trabajos que le han de conducir a la redacción de una tesis doctoral. Como autor de la presente memoria, he de decir que llevar a buen término el proyecto de investigación que he desarrollado ha sido posible gracias al apoyo y a la colaboración de una serie de personas a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Al Prof. Dr. Borja Fernández, que ha sido el mejor tutor/director que hubiera podido tener, mediando en todas las situaciones en las que, en el equipo de investigación, no alcanzábamos quórum, razonando cada uno de los pasos que dábamos en la realización de los trabajos, dándole sentido a todo ello y priorizando los temas.

Al Prof. Dr. Valentín Sans-Coma junto a quien, desde que empecé a trabajar con él, no he parado de evolucionar como estudiante, investigador y lo que es más importante, como persona. Pese a problemas, diversidad de opiniones, subidas y bajadas de humores, siempre ha tenido su puerta abierta cuando lo he necesitado. Su apoyo en momentos de flaqueza y sus ideas propias, a las que ha sabido darle sentido para introducirlas en esta

tesis, han sido la clave para el buen trabajo que hemos realizado juntos. Para mí, ha sido un honor que quisiera acabar su carrera docente dirigiendo, además de mis trabajos de fin de grado y de fin de máster, los de mi tesis doctoral.

A la Profa. Dra. Ana Carmen Durán, quien, pese a la gran cantidad de papeleo, reclamaciones y problemas que le llegan diariamente como Directora del Curso de Doctorado, siempre que he pegado a su puerta me ha prestado plena atención, dejando de lado lo que estuviera haciendo en aquel momento. Sin su ayuda, ninguna de las publicaciones que acompañan esta tesis tendría unas imágenes de tanta calidad. Me ha enseñado a prestar atención a las pequeñas cosas y, sobre todo, a manejar la óptica de forma semiprofesional.

Al Prof. Dr. Luis Javier Palomo, quien, como Director del Departamento de Biología Animal me ha dado todas las facilidades para realizar allí mis trabajos de investigación.

A la Dra. María del Carmen Fernández, quien, junto con el Prof. Palomo han sido padres para mí dentro y fuera del laboratorio, siempre muy cercanos y dispuestos a ayudarme en lo que fuera necesario.

A la Dra. Rita Carmona por hacer más amenas las comidas en el Departamento, aportando su granito de sinceridad en todo, algo que valoro muchísimo, y por la ayuda que me ha prestado en todo momento.

A los profesores del Departamento de Biología Animal, Dr. José Enrique García Raso, Dr. Ramón Muñoz-Chápuli, Dra. Carmen Salas y Dr. Sergio Gofas, por sus atenciones durante el periodo en el que he realizado la tesis.

Al Prof. Dr. Manuel Blasco, de la Universidad de Extremadura, por sus valiosos consejos y su inestimable ayuda en la obtención del material de estudio.

A la Dra. Cristina Rodríguez y al Dr. Alejandro López, por enseñarme desde cero todas las técnicas de laboratorio, con la paciencia que eso ha conllevado. Además de, hacerme participe de sus investigaciones y publicaciones.

A mis compañeros de carrera, en particular a cuatro de ellos por su apoyo, consejo, ayuda y un largo etcétera de cosas que hemos hecho juntos, todo lo cual me ha motivado para seguir adelante con este proyecto. Gracias a Fran Guerrero, a Miguel Ángel López-Unzu, a María Teresa Soto-Navarrete y a Sebastián Martín; ha sido un placer trabajar con vosotros.

A mi Madre, por acompañarme desde niño, estudiando conmigo todas las tardes, ya sea en persona o por teléfono desde su trabajo, explicándome como dividir, dándome

ganas de seguir hacia delante y no dejando nunca que me desviase del camino. Me ha enseñado a ser como soy y me siento muy orgulloso de ello.

A Rebeca Moreno que me ha aguantado las malas caras, las desesperaciones y los mosqueos y que ha sabido sobreponerse a ello, animándome en todo momento.

A mi Abuela y a mi Abuelo por enseñarme sus valores, darme la propinilla y hacer de comer todos los días para mí, fuese la hora que fuese.

A mis tías Elisa y Eva y a mis tíos Luis y Carlos, por poder contar con ellos para despejarme, haciendo deporte o simplemente comiendo, por todo el apoyo que me han mostrado en estos últimos años que han sido especialmente duros.

Finalmente, quiero hacer mención de una persona muy especial que hoy no se encuentra ya entre nosotros; una persona que deseaba verme presentar la tesis pero que, debido a lo vago que soy, no le pude dar esta alegría. Gracias Agustín, “papá”, porque, en el poco tiempo que te tuve, supiste enseñarme mucho más que otros en dieciocho años. Los valores que me inculcaste nunca se me olvidarán.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. Unidad temática de las publicaciones que avalan la tesis

El común denominador de los cuatro artículos que avalan la presente tesis es que se refieren a la anatomía y la histomorfología del tracto de salida del corazón de condrictios (peces cartilaginosos) y actinopterigios (peces con aletas radiadas). El orden en el que se exponen aquí dichos artículos no se corresponde con sus respectivas fechas de publicación, sino que se basa en sus contenidos. Esta discrepancia se debe a razones de tipo editorial y no a aspectos conceptuales. La realidad es que todos los trabajos se han gestado de forma casi paralela.

En primer lugar, se presenta una publicación que incluye una revisión histórica de los conceptos que se han sucedido, hasta la actualidad, sobre los componentes anatómicos del tracto de salida cardiaco de los condrictios y actinopterigios. En ella figura un capítulo final en el que se enumeran las perspectivas de futuro de la investigación sobre el tema, en el cual persisten abiertos varios interrogantes. Precisamente en este contexto se han llevado a cabo los estudios que han generado los otros tres artículos, uno de ellos dedicado a holocéfalos, otro a batoideos y el último a teleósteos.

2. Nomenclatura y especies citadas en la tesis

Con el fin de facilitar la lectura de los antecedentes que sustentan la formulación de los objetivos de la tesis, se ha creído oportuno especificar determinados aspectos sobre la nomenclatura anatómica empleada y la posición taxonómica de las especies de que se citan en el texto.

2.1. Nomenclatura

En lo sucesivo, se utilizarán los términos distal, anterior o cefálico y proximal, posterior o caudal par indicar la posición de los elementos del tracto de salida cardiaco con respecto al ventrículo o los ventrículos.

2.2. Especies citadas en el texto

Urocordados (Ascidias)

Ciona intestinalis (ciona): O. Enterogona; F. Cionidae

Agnatos

Lethenteron japonicum (lamprea ártica): O. Petromyzontiformes; F. Petromyzontidae

Condrictios

Holocéfalos

Chimaera monstrosa (quimera común): O. Chimaeriformes; F. Chimaeridae

Hydrolagus affinis (quimera ojo chico): O. Chimaeriformes; F. Chimaeridae

Harriotta raleighana (quimera picuda del Pacífico): O. Chimaeriformes; F. Rhinochimaeridae

Rhinochimaera atlántica (narigón sierra): O. Chimaeriformes; F. Rhinochimaeridae

Elasmbranquios

Scyliorhinus canicula (pintarroja): O. Carcharhiniformes; F. Scyliorhinidae

Galeus atlanticus (olayo atlántico): O. Carcharhiniformes; F. Scyliorhinidae

Galeus melastomus (bocanegra): O. Carcharhiniformes; F. Scyliorhinidae

Heterodontus portusjacksoni (tiburón de Port Jackson): O. Heterodontiformes; F. Heterodontidae

Raja asterias (raya estrellada): O. Rajiformes; F. Rajidae

Actinopterigios

Polypterus senegalus (bichir gris): O. Polypteryformes; F. Polypteridae

Acipenser naccarii (esturión del Adriático): O. Acipenseriformes; F. Acipenseridae

Lepisosteus osseus (pejelagarto narigudo): O. Lepisosteiformes; F. Lepisosteidae

Amia calva (amia): O. Amiiformes; F. Amiidae

Megalops atlanticus (pez lagarto): O. Elopiformes; F. Megalopidae

Megalops cyprinoides (tarpón del Indo-Pacífico): O. Elopiformes; F. Megalopidae

Pterothrissus gissu (gissu japonés): O. Albuliformes; F. Albulidae

Osteoglossum bicirrhosum (arawana plateada): O. Osteoglossiformes; F. Osteoglossidae

Alosa sapidissima (sábalo americano): O. Clupeiformes; F. Clupeidae

Cyprinus carpio (carpa): O. Cypriniformes; F. Cyprinidae

Danio rerio (pez cebra): O. Cypriniformes; F. Cyprinidae

Sparus aurata (dorada): O. Perciformes; F. Sparidae

Sarcopterigios

Latimeria chalumnae (celacanto): O. Celacanthiformes; F. Latimaeridae

3. Antecedentes y objetivos de la tesis

3.1. Los sistemas circulatorios de los vertebrados gnatostomados

Los vertebrados poseen un sistema circulatorio cerrado. La sangre fluye por el interior de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). El órgano encargado de impulsar la sangre a través de dichos vasos es el corazón. A diferencia de lo que se pensó en épocas pasadas, el corazón no es simplemente un vaso modificado, sino que, en su morfogénesis, intervienen elementos embrionarios diversos que acaban configurando un órgano, cuya anatomía difiere notablemente de unos grupos de vertebrados a otros. Desde el punto de vista funcional, cabe distinguir entre corazones a través de los cuales la sangre circula una sola vez durante el ciclo cardíaco y corazones por los que la sangre pasa dos veces durante dicho ciclo. En el primer caso se dice que el sistema circulatorio es sencillo. En el segundo caso se habla de un sistema circulatorio doble. Evolutivamente, el sistema circulatorio sencillo es el primitivo; lo poseen los vertebrados sin mandíbulas (agnatos) y los vertebrados mandibulados (gnatostomados) agrupados comúnmente bajo la denominación de peces, es decir, condricios, actinoptergios, dipnoos y celacantos. El sistema circulatorio doble es propio de los vertebrados tetrápodos.

En la figura 1 están ilustrados esquemáticamente cuatro de los diversos patrones de sistema circulatorio sencillo existentes y ello en función de los órganos en los que se realiza el intercambio de gases con el medio externo (Figs 1A-D). Los esquemas 1A y 1B corresponden a sistemas en los que el intercambio se realiza con el agua (respiración acuática). En el primer caso, que es el más frecuente, el fenómeno tiene lugar en las branquias; en el segundo caso, en la cavidad bucal. Los esquemas 1C y 1D son de sistemas circulatorios sencillos en los que se intercambian gases con el aire (respiración

aérea). En el primero, el intercambio tiene lugar en el tracto digestivo (Fig. 1C); en el segundo, se efectúa en el pulmón o vejiga natatoria (Fig. 1D). La figura 1E corresponde al sistema circulatorio doble de los tetrápodos. Se trata de un esquema genérico, en el que no se precisa ni el número de atrios y de ventrículos cardiacos, ni cuáles son los órganos respiratorios (habitualmente pulmones). Hay que destacar aquí, que en los sistemas circulatorios sencillos, la sangre, pobre en oxígeno, fluye una sola vez a través del corazón durante el ciclo cardiaco. En cambio, en los sistemas dobles existen dos circuitos intracardiacos. Por una parte, el corazón recibe sangre, pobre en oxígeno, procedente de todo el cuerpo del animal y la impulsa hacia los órganos respiratorios. Por otra parte, ingresa sangre oxigenada, procedente de los órganos respiratorios, que el corazón bombea hacia los órganos sistémicos.

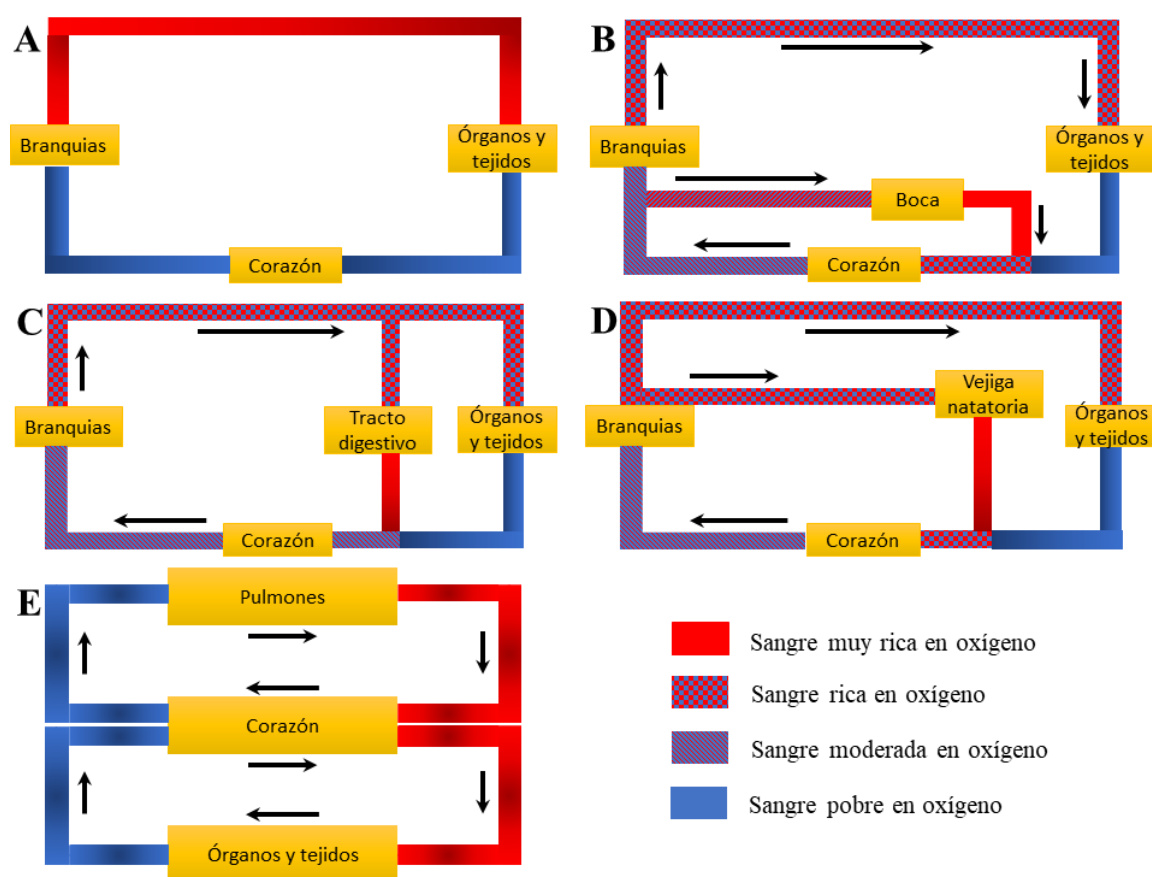


Figura 1. Representación esquemática de los cinco patrones de sistemas circulatorios existentes en función de los órganos en los que se realiza el intercambio de gases con el medio externo. A. Respiración en medio acuático; el intercambio de gases se realiza en las branquias. B. Respiración acuática en la que el agua pasa por la boca oxigena la sangre bombeada por el corazón. C y D. Sistemas circulatorios sencillos en los que se intercambian gases con el aire, en C el intercambio ocurre en el tracto digestivo y en D sucede en pulmón o vejiga natatoria. E. Corresponde al sistema circulatorio doble de los tetrápodos.

3.2. Las partes anatómicas del corazón de los vertebrados gnatostomados

Durante años se aceptó que el corazón primitivo de los gnatostomados, ubicado en la cavidad pericárdica, estaba constituido por un seno venoso, un atrio, un ventrículo y un cono arterioso (revisado por Simoes-Costa et al., 2005), dispuestos consecutivamente en sentido póstero-anterior del animal. La sangre entraba por el seno venoso y salía por el cono arterioso. De forma más o menos explícita, esta noción se basaba en la asunción de que los condriictios, cuyo corazón se ajusta a este diseño anatómico, son los vertebrados más antiguos que existen en la actualidad.

La configuración anatómica del corazón de los gnatostomados ha experimentado cambios muy notables a lo largo de la evolución y ello en consonancia principalmente con la persistencia de un sistema circulatorio sencillo (revisado en Simoes-Costa et., 2005) o la aparición de un sistema doble. Las modificaciones más aparentes atañen al atrio y al ventrículo. Frente a la presencia de un solo atrio y un solo ventrículo, como ocurre en todos los peces, los anfibios y muchos reptiles poseen dos atrios y un ventrículo. En otros reptiles, en las aves y en los mamíferos hay dos atrios y dos ventrículos. Al margen de cuáles sean los grupos zoológicos que presentan un modelo u otro de corazón, el número de atrios y ventrículos ha condicionado que, en muchos trabajos y libros de texto, se hable de corazones bi-, tri- y tetracamerales. Esta clasificación, sin embargo, está lejos de reflejar la variabilidad morfológica del corazón, en la que los componentes que conforman las regiones de entrada y de salida de sangre juegan un papel esencial. La realidad es que asignar la categoría de cámara a un determinado segmento cardíaco en uno u otro grupo de vertebrados es una tarea que dista de estar exenta de dificultades. Así, por ejemplo, mientras que, en los condriictios, el seno venoso y el cono arterioso, ambos con paredes miocárdicas, pueden describirse como cámaras, dichas regiones no aparecen como tales en aves y mamíferos adultos. En ambos grupos, el seno venoso está integrado en el atrio derecho y el cono arterioso embrionario no da lugar a una verdadera cámara. Se da así la paradoja de que los condriictios poseen, en realidad, un corazón no bi-, sino tetracameral (seno venoso, atrio, ventrículo y cono arterioso), en tanto que el de las aves y los mamíferos también lo es, pero por tener dos atrios y dos ventrículos.

Ante la dificultad de asignar la categoría de cámara a partes del corazón adulto que no aparecen como tales en determinados grupos, cuando sí lo hacen en sus antecesores, resulta más apropiado prescindir del término en cuestión y hablar de

componentes o de segmentos cardiacos. El término cámara más bien expresa una idea de oquedad, en tanto que componente y segmento resultan menos comprometidos para referirse a porciones diferenciables del corazón con independencia de sus respectivas formas y características histológicas.

Más allá de la complejidad estructural de los distintos segmentos cardiacos, lo que sí se puede convenir es que, en todos los gnatostomados, el corazón posee dos regiones hemodinámicas, una de entrada y otra de salida de sangre, cada una de ellas formada por componentes diversos (Simoës-Costa et al., 2005). El límite entre ambas regiones se sitúa entre el atrio y el ventrículo, en el caso de los peces, y entre los atrios y el o los ventrículos en el caso de los tetrápodos. Durante el ciclo cardíaco ambas regiones alternan sus movimientos de contracción y relajación, de manera que el corazón actúa como una verdadera bomba de propulsión.

En los condriictios y actinopterigios, la región de entrada de sangre, formada por el seno venoso y el atrio, está situada en posición dorsal con respecto a la región de salida o de eyección de sangre que, a su vez, consta del ventrículo y de la porción que lo conecta con la aorta ventral (Fig. 2). Los artículos que conforman la presente tesis se refieren a esta última porción, cuya definición no está exenta de controversias, tanto a nivel descriptivo como a nivel morfogénético (Grimes y Kirby, 2009). Por una parte, se trata de detallar cuáles son sus componentes anatómicos y, por otra, de precisar el origen embrionario de tales componentes y sus modificaciones durante el desarrollo hasta alcanzar su configuración definitiva en el adulto. Para nombrar la porción en cuestión se han empleado dos términos, cuyo significado no es exactamente el mismo: polo arterial (*arterial pole*) del corazón y tracto de salida (*outflow tract*) cardíaco (Grimes y Kirby, 2009).

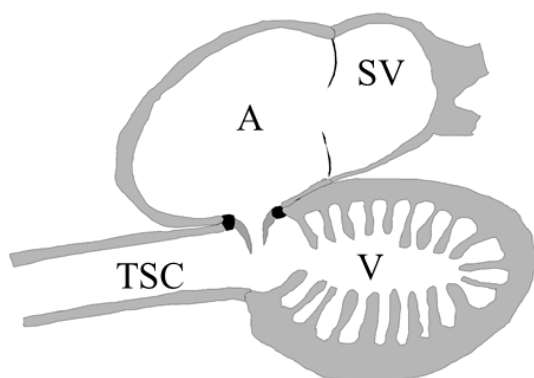


Figura 2. Representación esquemática de las regiones cardiacas, contenidas en la cavidad pericárdica, en condriictios y actinopterigios: seno venoso (SV), atrio (A), ventrículo (V), tracto de salida cardíaco (TSC). La composición anatómica e histológica del tracto de salida cardíaco constituye el eje central de las publicaciones que integran la presente tesis.

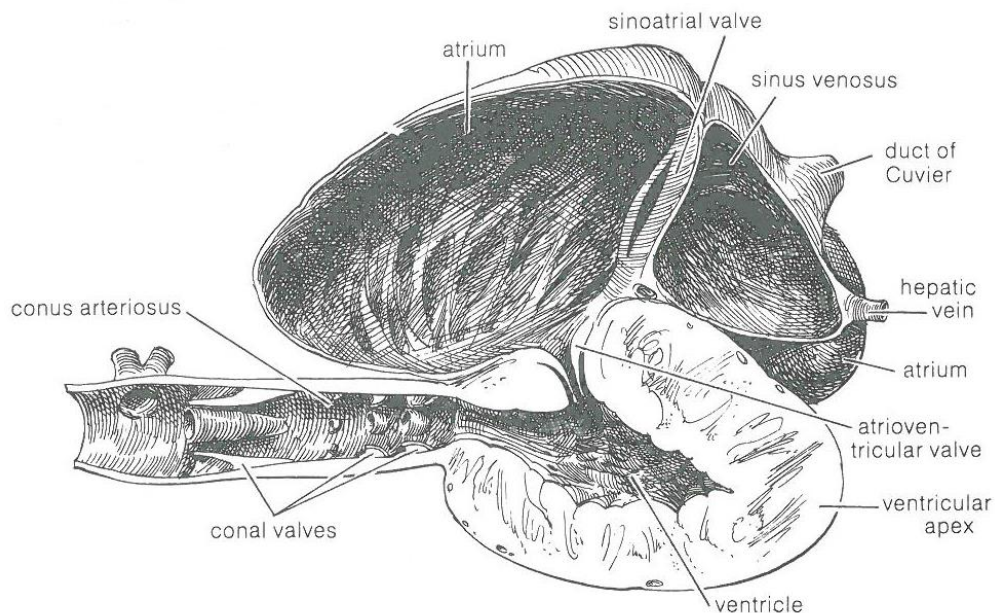
El polo arterial del corazón fue definido como la región miocárdica que rodea y soporta las válvulas de salida, junto con la región concordante de musculatura lisa y/o tejido fibroso que se extiende desde la base del llamado bulbo arterioso, en el caso los teleósteos, o desde la aorta ventral, en el de los elasmobranquios, hasta el ventrículo (Grimes y Kirby, 2009). El concepto, que se basa en la existencia de una superposición de miocardio y de musculatura lisa y/o tejido fibroso, resulta poco preciso desde el punto de vista anatómico. La identificación de dicha superposición tisular solamente es posible a base de técnicas microscópicas.

Desde la perspectiva anatómica, el concepto de tracto de salida es, sin duda, el menos comprometido en el caso de los sistemas circulatorios sencillos, en los cuales la sangre fluye una sola vez a través del corazón. En tal caso, el tracto de salida cardiaco es el segmento intrapericárdico que se extiende desde la salida del ventrículo hasta la aorta ventral (Rodríguez et al., 2013). La unión entre el tracto de salida y la aorta tiene lugar en el límite anterior de la cavidad pericárdica. Esta noción de tracto de salida cardiaco es aplicable a los embriones y adultos de peces, a los anfibios y a algunos reptiles. Sin embargo, su utilización cuando hay dos ventrículos, cada uno con su tronco arterial propio, es más dudosa. No obstante, la noción sí sirve para describir la anatomía del corazón en estadios de desarrollo tempranos. En realidad, muchos autores emplean la expresión “tabicación” o “septación” del tracto de salida cardiaco cuando se refieren al fenómeno por el cual se divide el conducto arterial primario del corazón de aves y mamíferos, dando lugar a los troncos arteriales que salen de uno y otro ventrículo en el adulto. Al margen de lo que acontece en los tetrápodos, se ha tomado la decisión aquí de incluir el término tracto de salida cardiaco en el título de la tesis, considerando que es el que mejor aúna los contenidos de los cuatro artículos que la componen.

3.3. El tracto de salida cardiaco de condriictios y actinopterigios: sinópsis histórica

Desde finales del siglo XIX hasta la actualidad, el tracto de salida cardiaco de los peces se ha venido describiendo a base de dos patrones anatómicos, el de los elasmobranquios y el de los teleósteos (Fig. 3). Así ocurre en muchos libros de texto de Zoología (Parker y Haswell, 1962; Weichert y Presch, 1975; Lawson, 1979; Johansen y Burggren, 1980; Nadal, 2001; Kardong 2002). Ello obedece, por una parte, a la necesidad de resumir conceptos en unas pocas líneas y, por otra, a que, desde principios del siglo XX hasta épocas muy recientes, ciertos postulados apenas fueron cuestionados.

A



B

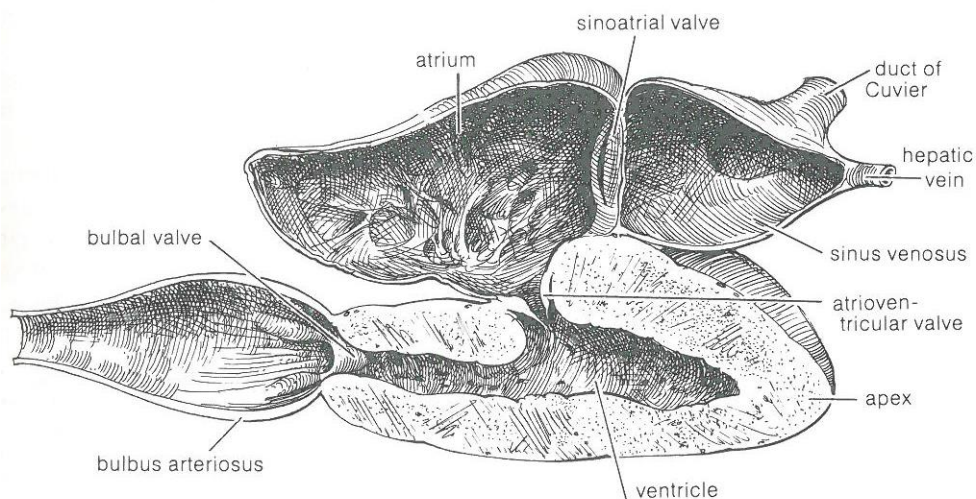


Figura 3. Esquemas de un corazón de elasmobranquio (arriba) y de un corazón teleósteo (abajo), según Lawson (1979). Nótese que en el caso del elasmobranquio, se considera que el tracto de salida cardiaco está formado exclusivamente por el cono arterioso, de naturaleza miocárdica, provisto de varias hileras de valvas (válvulas conales), mientras que, en el corazón del teleósteo, no existe el cono arterioso y, en su lugar, hay un bulbo arterioso no miocárdico. En tal caso, las válvulas del tracto de salida cardiaco se designan como válvulas bulbares.

La idea, admitida de forma general, era que el tracto de salida de los elasmobranquios (condriictos) está formado exclusivamente por el cono arterioso, de paredes miocárdicas, mientras que, en los teleósteos, el cono ha sido sustituido totalmente, o casi por completo, por el bulbo arterioso, carente de músculo cardiaco. El

cono arterioso está provisto de varias hileras transversales de válvulas (válvulas conales) en su cara luminal. En cambio, el bulbo arterioso no tiene válvulas. Las válvulas que, en los teleósteos, impiden el reflujó de sangre hacia el ventrículo están situadas entre el ventrículo y el bulbo. Por ello no se describían como válvulas conales, sino como ventrículo-bulbares (Santer, 1985).

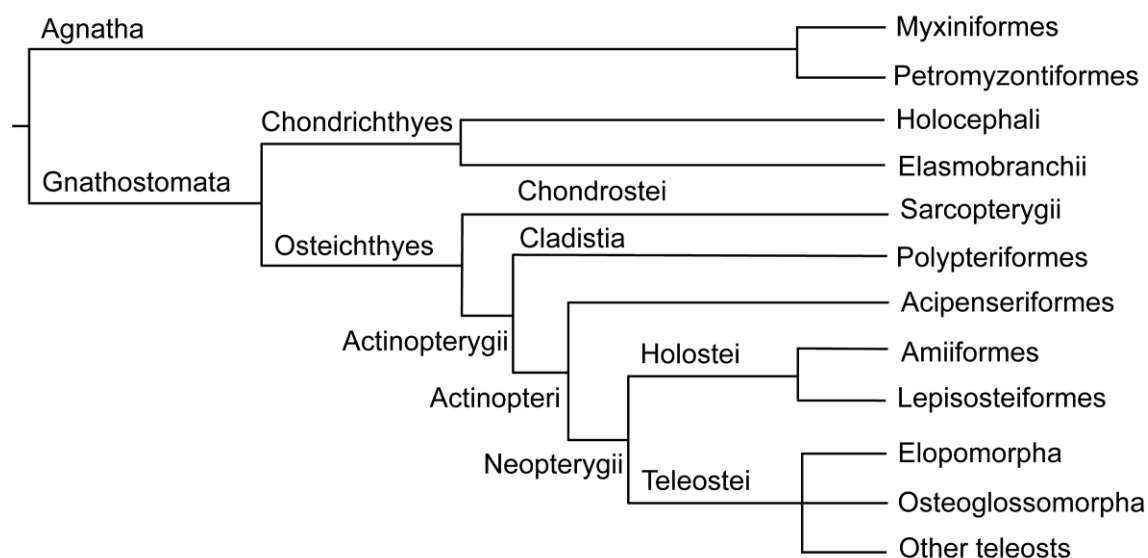


Figura 4. Esquema que muestra las relaciones filogenéticas de los grupos zoológicos citados en el texto. Acipenseriformes: esturiones y peces-espátula; Actinopterygii: actinopterigios salvo polipteriformes; Actinopterygii: peces con aletas radiadas; Agnatha: vertebrados sin mandíbulas; Amiiformes: amia; Chondrichthyes: peces cartilagosos; Chondrostei: peces cartilagosos con diferentes grados de osificación; Cladistia: peces con una aleta dorsal con radios independientes; Elasmobranchii: tiburones, rayas, torpedos y peces sierra; Elopomorpha: peces con larvas leptocéfalas, incluyendo tarpones, malachos, macabijos y anguilas; Gnathostomata: peces mandibulados; Holocephali: quimeras; Holostei: peces ganoideos con esqueleto óseo bien desarrollado; Lepisosteiformes: pejelagartos; Myxiniiformes: mixines; Neopterygii: peces con un amplio rango de caracteres que los diferencian de Cladistia y Chondrostei; Osteichthyes: peces óseos + tetrápodos; Osteoglossomorpha: peces con lenguas dentadas o huesudas, incluyendo arapaimas, arañas, peces mariposa y peces elefante; Petromyzontiformes: lampreas; Polypteriformes: bichires; Sarcopterygii: peces con aletas lobuladas (celacantos y peces pulmonados) + tetrápodos; Teleostei: peces óseos con un maxilar y un premaxilar totalmente móviles y aletas caudales homocercas.

La realidad es que esta visión, tan simplificada, del tracto de salida del corazón de los peces no se ajusta a los conocimientos que realmente se fueron generando desde principios del siglo XIX. Por ello, el examen y el análisis de la información, a menudo contradictoria, que se ha producido hasta hoy en día en ámbitos especializados es de suma importancia para entender el estado actual del tema y los interrogantes que aún están

abiertos. En esta línea, se exponen a continuación los aspectos históricos que han constituido la base de los objetivos de la presente tesis. Para facilitar la comprensión de las explicaciones se ha insertado el mismo diagrama (Fig. 4) que consta en el artículo de Lorenzale et al. (2018) y que compendia las relaciones filogenéticas entre los grupos zoológicos que se citan en el texto.

4. Siglo XIX

4.1. El bulbo arterioso como único componente del tracto de salida cardiaco de los peces

A principios del siglo XIX se consideraba que los tractos de salida cardiacos de los condriictios y los teleósteos eran semejantes desde el punto de vista estructural. La idea había nacido de Cuvier (1805) al describir que, en los peces, el orificio arterial del ventrículo cardíaco no está conectado directamente a la aorta, sino a un abultamiento que él mismo denominó bulbo o pedículo. Según el autor, la forma del bulbo difiere notablemente entre las especies. En los tiburones y en las rayas es cilíndrico, mientras que, en los teleósteos, es piriforme u oval. Una observación interesante del propio Cuvier (1805) fue que el bulbo parecía ser similar al ventrículo en algunos casos y semejante a una arteria, en otros. Sin embargo, sus observaciones no fueron más allá de esta constatación.

Quien sí puso de manifiesto la existencia de diferencias estructurales entre el bulbo piriforme de los peces óseos y el bulbo cilíndrico de los tiburones y los ganoideos fue Tiedemann (1809). Es interesante reseñar aquí que, en aquella época e incluso más adelante, se agrupó bajo el nombre de ganoideos una serie de especies que, en la actualidad, se incluyen en los taxones Cladistia, Chondrostei y Holostei (Betancur-R et al., 2013). De forma concomitante al trabajo de Tiedemann (1809), Home (1809, 1913) expuso su idea de que, en los peces de fondos acuáticos, la pared del tracto de salida cardiaco es principalmente muscular, mientras que, en los peces de superficie, dicha musculatura está muy reducida o incluso llega a faltar. Las observaciones de ambos autores, que apuntaban hacia divergencias anatómicas importantes entre diferentes grupos de peces, pasaron inadvertidas e incluso se llegaron a olvidar cuando, algunos años más

tarde, Meckel (1831) apoyó la idea de Cuvier (1805), según la cual los peces cartilagosos y los peces óseos tienen un tracto de salida cardíaco similar.

Müller (1842, 1845) fue el primero en utilizar el término binomial bulbo arterioso (*bulbus arteriosus*) para denominar el segmento cardíaco que está intercalado entre el ventrículo y la aorta ventral en los peces. Lo describió como una porción muscular del corazón provista de válvulas. En los condrictios y en grupos antiguos de actinopterigios, el bulbo arterioso consistía en un gran cilindro que contenía varias filas transversales de válvulas. En los teleósteos, en cambio, solamente había una fila transversal de válvulas, situada en el límite entre el ventrículo y el bulbo arterioso. Según Müller (1842, 1845), el bulbo muscular de los condrictios y actinopterigios antiguos es una cámara cardíaca que colabora en la impulsión de la sangre hacia la aorta ventral (*truncus arteriosus*, según el autor). A diferencia de ello, el bulbo de los teleósteos no debe considerarse una cámara, sino una extensión caudal engrosada de la aorta ventral que no actúa a modo de bomba de propulsión.

Es interesante indicar que las características anatómicas y fisiológicas del bulbo arterioso, así como la cantidad y la localización de sus válvulas se utilizaron como caracteres taxonómicos. El propio Müller (1845) concluyó que tales caracteres servían para separar los condrictios y ganoideos (actinopterigios antiguos) de los teleósteos. Esta idea la compartió Stannius (1854) que reafirmó, a base de sus propios estudios, que el bulbo de los teleósteos es una entidad anatómica distinta del bulbo de los condrictios y ganoideos.

4.2. El concepto de cono arterioso según Gegenbaur

En 1866, Gegenbaur dijo que el bulbo arterioso de los condrictios debiera interpretarse como una extensión tubular del ventrículo provista de válvulas. Esta extensión también existía en los teleósteos, pero de tamaño mucho menor. A cambio, la porción distal del bulbo arterioso de los teleósteos se habría diferenciado en un segmento, distinto del bulbo de los condrictios, y que, en realidad, era la porción inicial de la aorta ventral. Sobre esta base, Gegenbaur (1866, 1891) propuso mantener el término bulbo arterioso para designar exclusivamente la porción intrapericárdica de la aorta ventral de los teleósteos. A la vez, acuñó el término cono arterioso para nombrar la extensión del ventrículo que soporta las válvulas de salida del corazón. De esta forma quedó establecido el concepto de que, en los condrictios, el tracto de salida cardíaco está formado solamente

por el cono arterioso, provisto de válvulas, mientras que, en los teleósteos, el tracto de salida consta de un cono arterioso de pequeño tamaño, que soporta las válvulas, y un bulbo arterioso, no miocárdico, bien desarrollado, de origen aórtico.

5. Siglo XX

5.1. Componentes del tracto de salida cardíaco en peces

En su gran obra sobre anatomía comparada de los vertebrados, Gegenbaur (1901) hizo una revisión exhaustiva de la información sobre el corazón de los peces que se había obtenido durante el siglo precedente. Su concepto sobre el tracto de salida cardíaco, que había de prevalecer durante años, es el siguiente. En los condriictios y en los ganoideos, el tracto de salida está compuesto por el cono arterioso, que es una extensión contráctil del ventrículo provista de válvulas, cuya cantidad y tamaño varían ampliamente entre las especies. El cono arterioso está conectado al *truncus arteriosus* (aorta ventral), del cual parten los arcos aórticos. En los ganoideos, el cono arterioso ha experimentado una disminución, tanto en tamaño como en número de válvulas. El cono persiste como un elemento anatómico conspicuo en los teleósteos más antiguos. Sin embargo, en la mayoría de especies modernas, el cono es rudimentario en concomitancia con un gran desarrollo del bulbo arterioso.

5.2. El cono arterioso de los condriictios

Partiendo de la idea de que el cono arterioso es el único componente del tracto de salida cardíaco de los condriictios, uno de los temas que suscitó gran interés durante el siglo XX se refiere a la variación en cantidad, forma, tamaño y localización de las válvulas conales. La cuestión ya había recibido especial atención, con anterioridad, por parte de Gegenbaur (1866) y Stöhr (1876), a quienes les siguió un considerable número de autores (revisado en Sans-Coma et al., 1995). En este contexto es interesante resaltar la conclusión a la que llegaron O'Donoghue y Abbott (1928). Según constataron estos autores, en la mayoría de los elasmobranquios, las válvulas de la primera fila (fila distal) son mayores que las restantes. Por su parte, White (1936) sugirió que, a pesar de existir cierta variación entre individuos de una misma especie, el número de válvulas conales

podía constituir un carácter de utilidad para la clasificación de los elasmobranquios. A finales de siglo, Sans-Coma et al. (1995) publicaron un artículo sobre la anatomía e histología de las válvulas conales de *S. canicula*. Dicho trabajo es el único en el que se describe de forma detallada la estructura de las válvulas del tracto de salida cardiaco en condriktios, pero hay que subrayar que los resultados obtenidos se refieren a una sola especie de elasmobranquio.

Otro aspecto que atrajo la atención de numerosos autores, ya desde la mitad del siglo XIX, se refiere a la posible función del cono arterioso (Pettigrew, 1864; Stöhr, 1876; Gegenbaur, 1866; Keith, 1924; Daniel, 1934; March et al., 1962; Sudak, 1965). Según compendiaron Satchell y Jones (1967), se sugirió que el cono actuaba a modo de ventrículo extra, como reservorio elástico que servía para minimizar las fluctuaciones de la presión sanguínea o como una estructura valvular que regulaba el flujo de eyección, del ventrículo a la aorta ventral. Los estudios de March et al. (1962) y Sudak (1965) consiguieron demostrar que la sístole del cono tiene lugar antes de que el ventrículo se relaje. Satchell y Jones (1967) investigaron la fisiología del cono del tiburón de Port Jackson, *H. portusjacksoni*, que posee tres filas transversales de válvulas. Los resultados que obtuvieron indicaron que, al menos en esta especie, las válvulas posteriores, ubicadas cerca de la unión ventrículo-conal, son las primeras en cerrarse, incluso antes de que finalice la sístole ventricular. El cierre de las válvulas de la fila media tiene lugar antes de que se abran las válvulas de la fila posterior, mientras que las de la fila anterior se cierran cuando las de la fila media se abren, al final de la sístole conal. A partir de estas observaciones, Satchell y Jones (1967) formularon la hipótesis de que el cierre de las válvulas anteriores no se produce hasta que la presión intrapericárdica negativa, generada por la eyección ventricular, no alcanza su valor más bajo.

5.3. El cono arterioso de los teleósteos

Un tema que ha motivado notables controversias desde el inicio del siglo XX ha sido el de la denominada regresión del cono arterioso en los teleósteos. La constatación de que, en dicho grupo, el cono se había reducido de tamaño hasta hacerse rudimentario la había expuesto y comentado ya Boas (1880) al describir la presencia de dos filas transversales de válvulas en el cono arterioso de *Albula* sp. (citado como *Butirinus* sp.), perteneciente a los Elopomorfos, el clado más antiguo de teleósteos actuales (Amemiya et

al., 2006). No obstante, la cuestión no habría de adquirir verdadero relieve hasta pasados veinte años.

En 1900, Hoyer dijo que el cono arterioso existe en todos los teleósteos, al menos en estadios embrionarios; sin embargo, en los adultos de muchas especies, el miocardio conal está incorporado parcialmente al ventrículo. Basándose en esta idea, Smith (1918) estudió el tracto de salida de los corazones de un total de 47 especies de teleósteos pertenecientes a 13 órdenes. Once de ellas presentaban un cono arterioso miocárdico conspicuo. En otras once había un cono rudimentario compuesto por tejido elástico, en cuyo interior había una pequeña cantidad de miocardio dispuesto de forma dispersa. En las 25 especies restantes, el cono no existía. A partir de estos hallazgos y en concordancia con el razonamiento de Hoyer (1900), Smith (1918) concluyó que la desaparición del cono en algunos teleósteos adultos era atribuible, en muchos casos, a su anexión al ventrículo. En otros casos, la ausencia de cono parecía ser consecuencia de una elongación del bulbo arterioso en sentido caudal. Entretanto, Senior (1907 a,b,c) había reseñado la presencia de un cono arterioso con dos filas transversales de válvulas en tres especies que, como *Albula* sp., pertenecen a los elopomorfos: el pez lagarto, *M. atlanticus* (citado como *Tarpon atlanticus*), *M. cyprinoides* y *P. gissu*. Estos hallazgos fueron considerados como una evidencia inequívoca de la progresiva reducción del tamaño del cono a lo largo de la evolución de los teleósteos.

En este punto, es interesante referirse al estudio de Greer-Walker et al. (1985) sobre el corazón de diversas especies que habitan zonas marinas profundas, todas ellas pertenecientes a la familia Macrouridae. En ninguna de ellas detectaron la mínima traza de cono arterioso. La única fila transversal de válvulas existente a la salida del corazón emergía del propio ventrículo. Esta observación es particularmente relevante en relación a los datos sobre la presencia de cono en los teleósteos, que son relativamente recientes y se comentan más adelante.

5.4. El bulbo arterioso de los teleósteos

Otra cuestión que fue muy debatida durante todo el siglo XX atañe al origen evolutivo del bulbo arterioso de los teleósteos. Boas (1901) formuló la hipótesis de que el bulbo se originó a partir de la porción proximal de la aorta ventral. A lo largo de la evolución, el bulbo debió extenderse distalmente hasta reemplazar al cono arterioso. La idea se basaba en el hecho de que, desde la perspectiva histológica, el bulbo, carente de

miocardio, se asemeja mucho más a una arteria que a cualquier segmento cardiaco. La idea de Boas (1901) fue aceptada por autores como Bridge (1904), Krause (1923), Goodrich (1930) y Grodzinski (1938) y figuró, durante años, en los libros de texto (p. ej., Bertin, 1958; Parker y Haswell, 1962; Weichert y Presch, 1975; Lawson, 1979), y todo ello a pesar de que Senior (1909) había demostrado que, en *A. sapidissima*, el bulbo se forma dentro de la cavidad pericárdica.

El estudio histológico y bioquímico del bulbo arterioso de *C. carpio* realizado por Licht y Harris (1973) dio resultados que contradecían el punto de vista anterior. Dichos resultados indicaban que el bulbo es distinto de la aorta. Las mayores diferencias se referían a la disposición espacial y a las características bioquímicas de la elastina bulbar. Sobre esta base, Licht y Harris (1973) concluyeron que el bulbo arterioso es una parte intrínseca del corazón de los teleósteos, derivada posiblemente del cono arterioso primitivo. En otras palabras, el bulbo arterioso debe considerarse un componente propiamente cardiaco del tracto de salida, opinión que fue compartida por autores como Priede (1976), Yamauchi (1980), Satchell (1991) y Farrell y Jones (1992).

5.5. El concepto de tracto de salida cardiaco de los peces según Parsons

En 1930, Parsons publicó un estudio sobre el cono arterioso del corazón de los peces en el que contradijo varios conceptos que asumían muchos autores de aquella época. Parsons consideraba que cualquier porción del tubo cardiaco ubicada dentro de los límites del espacio pericárdico forma parte del corazón propiamente dicho. Este punto de vista entraba en claro conflicto con la hipótesis de que el bulbo arterioso era una extensión caudal de la aorta ventral. Parsons decidió utilizar el término cono arterioso para designar toda la porción morfológica anterior del tubo cardiaco primitivo. Sobre esta base, examinó corazones de diversos elasmobranquios y actinopterigios. En dos especies, es decir, en *S. canicula*, citado como *Scyllium canicula*, y en el bocanegra, *Galeus melastomus*, citado como *Pristurus melastomus*, observó que la capa muscular de la porción distal del cono no alcanzaba el límite pericárdico (Figs 5A, B). Este hallazgo, que pasó inadvertido durante años, constituyó el punto de partida de investigaciones recientes que han demostrado la existencia del bulbo arterioso en los condriictos.

En el amia, *Amia calva*, Parsons (1930) encontró una disposición del tracto de salida cardiaco similar a la de *S. canicula* y *G. melastomus*. En cambio, en ninguno de los teleósteos que examinó, existía capa miocárdica alguna. Según palabras del propio

Parsons (1930), la pared del cono de los teleósteos está formada por tejido conjuntivo, fibras musculares lisas y fibras elásticas. Al margen del considerable valor que tiene el trabajo de Parsons (1930) desde el punto de vista anatómico, su proposición de que todo el tracto de salida cardíaco de los peces equivale al cono arterioso no ha tenido eco entre los especialistas. Lo mismo ha ocurrido con su hallazgo de la porción distal del tracto de salida exenta de miocardio en especies de elasmobranquios. Una afirmación de Santer (1985), en su amplio trabajo sobre la morfología e inervación del corazón de los peces, zanjó esta última cuestión: el cono arterioso es la cámara más anterior del corazón de los elasmobranquios y, por tanto, confluyente con la aorta ventral.

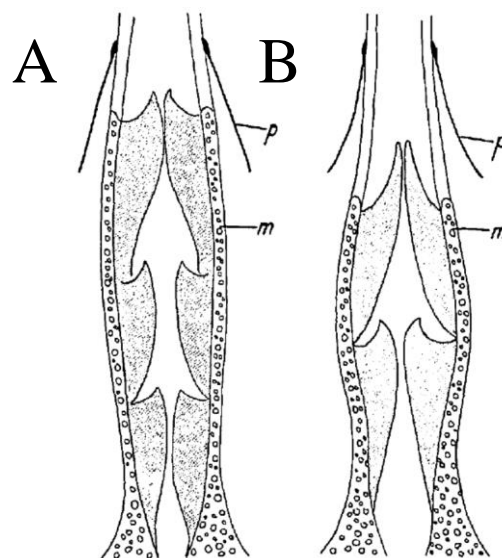


Figura 5. Esquemas del tracto de salida cardíaco de *Sciliorhynchus canicula* (citado como *Scyllium canicula*) y de *Galeus melastomus* (citado como *Pristuris melastomus*) incluidos en el trabajo de Parsons (1930). Obsérvese que, en ambas especies, el miocardio (m) no llega hasta el límite anterior de la cavidad pericárdica (p)

6. Siglo XXI

Según se acaba de exponer, las investigaciones realizadas durante los siglos XIX y XX sobre el tracto de salida cardíaco de los peces suscitaron numerosas polémicas que crearon confusiones conceptuales notables. Con todo, al finalizar el siglo XIX, no se habían alterado apenas las nociones que derivaban de los puntos de vista de Gegenbaur (1866, 1891, 1901). La realidad es que se seguía asumiendo que los condriictos solamente poseen cono arterioso y que, en los actinopterigios, el cono se había reducido hasta

convertirse en un componente cardíaco rudimentario, sino inexistente, como parece ocurrir en los individuos adultos de muchas especies de teleósteos. El bulbo arterioso, que supuestamente se había originado en actinopterigios antiguos como los amiiformes, había adquirido un gran desarrollo en los teleósteos. Sin embargo, los estudios que se han llevado a cabo desde principios del presente siglo han modificado sustancialmente las nociones clásicas. A continuación, se enumeran los hitos fundamentales que han conducido al estado actual de la cuestión, dejando para más adelante el análisis crítico de la información publicada, ya que dicho análisis constituye una parte esencial del primer artículo (Lorenzale et al., 2018a) que avala la presente tesis.

6.1. El tracto de salida cardíaco en condriictios y actinopterigios antiguos

La presencia de un tracto de salida cardíaco formado por un solo componente, el cono arterioso, no se atribuía solamente a los condriictios, sino también a casi todos los grupos antiguos de actinopterigios, es decir, a los polipteriformes, acipenseriformes y lepisosteiformes (Fig. 4). En los amiiformes, sí parecía existir un segundo componente, no miocárdico, de posición distal con respecto al cono, que se denominó bulbo arterioso por parte de diversos autores (revisado en Grimes, 2015). De manera más o menos explícita, esta circunstancia se interpretaba como que el bulbo arterioso había aparecido en algún momento, relativamente temprano, de la historia evolutiva de los peces con aletas radiadas y que, más adelante, ya en los teleósteos, había sustituido al cono arterioso de forma parcial o total.

En los últimos quince años han visto la luz varios trabajos que han modificado sustancialmente las nociones clásicas. En conjunto, los resultados obtenidos se pueden compendiar en el siguiente enunciado: el tracto de salida cardíaco de los condriictios y actinopterigios, antiguos y actuales, consta de un cono arterioso y un bulbo arterioso, ambos ubicados dentro de la cavidad pericárdica. El cono, que es miocárdico, es la parte proximal del tracto de salida. El bulbo, carente de musculatura cardíaca, es la parte distal del tracto de salida y comunica el cono con la aorta ventral. Los principales hallazgos que han conducido a estas afirmaciones se exponen a continuación siguiendo un orden que no responde a la cronología de las publicaciones, sino a las relaciones de afinidad y parentesco entre los distintos grupos estudiados (Fig. 4). En este contexto, es importante subrayar que las observaciones de Parsons (1930), citadas anteriormente, fueron uno de

los principales detonantes de las investigaciones que han conducido a la concepción actual de la cuestión.

El primer trabajo en el que se demostró la existencia de un bulbo arterioso en el tracto de salida del corazón de los condriictos (Fig. 6) es el de Durán et al. (2008).

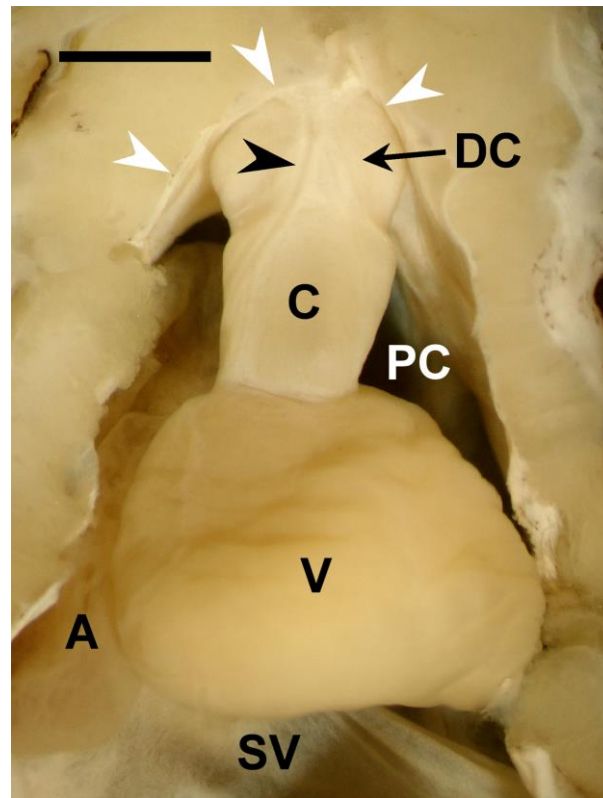


Figura 6. Visión ventral del corazón de un *Galeus atlanticus* adulto. Imagen publicada por Durán et al. (2008). Se trata del primer ejemplar en el que se demostró que, en los elasmobranquios, el tracto de salida cardíaco está formado por un cono arterioso (C: componente proximal en el artículo original) y un bulbo arterioso (DC: componente distal en el artículo original). A =atrio; PC = cavidad pericárdica; SV = seno venoso; V = ventrículo. La cabeza de flecha apunta hacia una arteria coronaria. Las flechas blancas indican el límite anterior del pericardio.

El estudio se realizó en una sola especie de elasmobranquio, *G. atlanticus*. Sin embargo, en investigaciones posteriores se obtuvieron resultados que sugieren de manera sólida que el bulbo arterioso existe en todos los condriictos adultos (Durán et al., 2010, 2015; Borucinska et al., 2012, Rodríguez et al., 2016). El bulbo de *G. atlanticus* carece de miocardio, lo cual lo diferencia claramente del cono arterioso. En cambio, su estructura es similar a la de la aorta ventral. Ambos, el bulbo y la aorta constan básicamente de musculatura lisa, elastina, colágeno y glucosaminoglucanos, pero la disposición de estos elementos es distinta (Durán et al., 2008). Además, el bulbo está cubierto por el epicardio

y está recorrido longitudinalmente por los troncos arteriales coronarios, que no son meros *vasa vasorum* (Durán et al., 2008). La identidad, como tal, del bulbo arterioso en los condictios se confirmó mediante un estudio de embriones de *G. atlanticus* (Rodríguez et al., 2013). Los datos obtenidos mostraron que en los estadios tempranos del desarrollo embrionario, todo el tracto de salida cardiaco es de naturaleza miocárdica. Seguidamente, entre el cono y la aorta embrionaria se desarrolla un nuevo segmento que se ubica dentro de la cavidad pericárdica y que es el precursor del bulbo arterioso. En él van apareciendo células musculares lisas, fibroblastos, elastina y colágeno que conforman un componente del tracto de salida con entidad propia.

El primer indicio de que existe un bulbo arterioso en actinopterigios antiguos, al margen de los amiiformes, procede de estudios sobre el corazón de *A. naccarii*, (Icardo et al. 2002 a,b). Estos autores describieron que, en dicha especie de esturión, el tracto de salida cardiaco está formado principalmente por un cono arterioso miocárdico. Sin embargo, anotaron que la aorta ventral presenta dos porciones, una intrapericárdica y otra extrapericárdica, y que ambas porciones difieren en la disposición espacial de sus elementos histológicos. Estas observaciones fueron la base sobre la que se planificó y se efectuó una investigación sobre el desarrollo del corazón de *A. naccarii*, utilizando embriones y alevines (Guerrero et al., 2004). Los resultados obtenidos probaron que la porción intrapericárdica de la aorta ventral, descrita por Icardo et al. (2002 a,b), se forma con posterioridad a la diferenciación de la porción aórtica extrapericárdica. Al igual que se habría de demostrar casi una década más tarde en *G. atlanticus* (Rodríguez et al. 2013), el tracto de salida cardiaco de *A. naccarii* es enteramente miocárdico a principios del desarrollo para, seguidamente, aparecer el componente no miocárdico, que acaba siendo el bulbo arterioso. Cuando se realizó el estudio embriológico en el esturión se había publicado un artículo (Hu et al., 2000) sobre la formación del corazón en el teleosteo *D. rerio*. La secuencia de eventos que llevan a la formación del bulbo arterioso de esta especie es muy semejante a la que acontece en la formación del bulbo de *G. atlanticus* y de *A. naccarii*. Ello significa que el bulbo es un componente del tracto de salida común a condictios y actinopterigios, como se ha matizado anteriormente.

En este contexto, falta revisar qué ocurre en polipteriformes y lepisosteiformes. En cuanto a los primeros, Grimes et al. (2010) señalaron someramente que el tracto de salida cardiaco en *P. senegalus* consta de dos componentes intrapericárdicos, proximal y distal con respecto al ventrículo. Como demostraron más adelante Durán et al. (2014), el componente proximal, que es muy largo y tiene una elevada cantidad de válvulas, es el

cono arterioso. El componente distal, carente de miocardio, es equivalente al bulbo arterioso del esturión y del pez cebra desde el punto de vista estructural. Sobre el tracto de salida del corazón de los lepisosteiformes hay información antigua que lo describe como formado solamente por el cono arterioso. En cambio, en un extenso trabajo reciente sobre la citada región cardíaca en actinopterigios antiguos, Grimes (2015) indica que, en *L. osseus*, dicha región está constituida por dos porciones, proximal y distal, sin nombrar específicamente al bulbo arterioso.

6.2. El tracto de salida cardíaco en teleósteos

Recientemente se ha publicado el descubrimiento del corazón fosilizado de un ejemplar de *Rhacolepis buccalis* procedente del Cretáceo de Brasil (Maldanis et al., 2016). *R. buccalis* es un teleósteo que pertenece al grupo extinto de los Crossognathiformes. Al margen de la trascendencia que tiene el hallazgo en sí mismo, al demostrar que la fosilización de un corazón es posible, lo que resulta de gran interés es que *Rhacolepis* poseía un cono arterioso con cinco filas transversales de válvulas. Según Maldanis et al. (2016), este hecho ilustra que, en los teleósteos, se pasó evolutivamente de un tracto de salida cardíaco dominado por un cono arterioso provisto de varias válvulas a otro, en el que el componente principal pasó a ser el bulbo arterioso. Ello casa con la presencia de un cono con dos filas de válvulas en especies del antiguo clado de los elopomorfos (Senior, 1907 a,b,c) y con la existencia de tan solo una fila de válvulas en los demás grupos de teleósteos examinados hasta ahora.

La pregunta que seguía en pie a principios de este siglo era si el cono arterioso se presenta como tal en todos los teleósteos adultos, es decir, como un componente miocárdico, más o menos desarrollado, que soporta las válvulas de salida o válvulas conales. Según Hoyer (1900) Smith (1918) y Greer-Walker et al. (1985) éste no es el caso, sino que, en muchas especies, el cono no se percibe en los adultos. Retomando la cuestión, Icardo (2006) estudió el corazón de un total de 29 especies pertenecientes a 19 familias de diez órdenes distintos. Según sus hallazgos, en la mayoría de los teleósteos adultos existe un cono miocárdico, más o menos conspicuo, que soporta las válvulas. A partir de ahí, Icardo (2006) concluyó que, en los teleósteos, el cono arterioso es una entidad anatómica que no se ha perdido a lo largo la evolución y que constituye una parte fundamental del tracto de salida cardíaco. Asimismo, Icardo (2006) ilustró, a base de imágenes obtenidas en *S. aurata*, que el bulbo arterioso tiene un crecimiento alométrico

positivo con respecto al cono arterioso durante la vida embrionaria, lo cual determina que el cono sea de pequeño tamaño en el adulto.

La anatomía, externa e interna, la histología, la ultraestructura, la embriología y la fisiología del bulbo arterioso de los teleósteos han dado lugar a una bibliografía muy extensa (véanse las revisiones de Santer, 1985, Icardo, 2012, 2017, y Lorenzale et al., 2017). Lo que se sabe hasta ahora permite decir que la estructura de dicho segmento cardiaco es altamente variable y poco menos que particular de cada especie (Icardo, 2012).

La mayor novedad respecto al bulbo arterioso de los teleósteos la ha constituido el reciente estudio de Moriyama et al. (2016). Estos autores realizaron experimentos de manipulación genética en embriones de *D. rerio* concluyendo que el bulbo arterioso, como tal, es una novedad evolutiva dentro de los teleósteos. Esta afirmación surgió de su demostración de que la elastina tipo b, que se generó por duplicación del gen *elastina* en los teleósteos, está involucrada en la morfogénesis del peculiar bulbo arterioso de estos peces. Una insuficiencia de elastina b produce una diferenciación ectópica de miocardiocitos en el futuro bulbo arterioso. Sobre esta base, los autores sugieren que, tras la duplicación del gen *elastina*, la elastina b adquirió una nueva función, pasando a regular el destino de las células del tracto de salida cardiaco. Ello propició que el sistema circulatorio de los teleósteos deviniera más sofisticado, con un bulbo arterioso singular, que contribuyó a la radiación explosiva de este grupo de peces en el medio acuático. Según la perspectiva de Moriyama et al. (2016), el bulbo debe considerarse una autopomorfía de los teleósteos.

Es evidente que las conclusiones de Moriyama et al. (2016) han venido a sembrar dudas importantes sobre la noción de que el bulbo arterioso sea un componente del tracto de salida común a todos los condrictios y actinopterigios. Ello ha determinado la valoración crítica de dicho postulado que figura en la primera publicación (Lorenzale et al., 2018a) que forma parte de la presente tesis.

7. Fundamentos de los objetivos de la tesis

Cuando se formularon los objetivos de la presente tesis, que giraban en torno al tracto de salida del corazón de los peces, la primera cuestión que se planteó fue la de reunir y evaluar la información existente sobre el tema desde el inicio del siglo XIX,

cuando Cuvier (1805) empleó el término bulbo (o pedículo) para designar la citada región cardíaca. Como se ha compendiado en los apartados anteriores, los componentes anatómicos del tracto de salida cardíaco de condrictios y actinopterigios fueron objeto de estudios diversos, pero, hasta finales del siglo pasado, su interpretación morfológica no se modificó con respecto a la proposición de utilizar el término como arterioso para nombrar el componente miocárdico y de mantener el término bulbo arterioso para referirse al componente no miocárdico (Gegenbaur, 1866, 1901). Los diversos intentos de determinar el origen embrionario y evolutivo de uno y otro componente habían causado controversias notables, pero no se había logrado ninguna solución consensuada entre los autores.

El siglo XX trajo consigo nuevos enfoques de la cuestión, basados en métodos histomorfológicos, embriológicos, moleculares y paleontológicos. La interpretación de los resultados que se obtuvieron tampoco estuvo exenta de polémica, lo cual se tradujo en una nomenclatura a menudo confusa e, incluso contradictoria, de los componentes del tracto de salida. Hace casi una década, Grimes y Kirby (2009) publicaron un artículo sobre la filogenia y la ontogenia de dicha región cardíaca en peces. En él evaluaron, desde la perspectiva molecular, diversas ideas sobre la composición del tracto de salida, expuestas hasta entonces por otros autores. Así constataron la gran discrepancia existente en la nomenclatura, no solo en peces, sino en todos los vertebrados. Grimes y Kirby (2009) evidenciaron que, a pesar de ello, hay un elevado grado de conservación arquitectónica, fisiológica y genética en la porción de salida del corazón de los vertebrados. Sobre esta base y siguiendo la proposición de Anderson (2003) de que la terminología del tracto de salida cardíaco debería simplificarse para poderla aplicar a todos los vertebrados, Grimes y Kirby (2009) concibieron un diseño histomorfológico generalizable, que fue matizado con mayor detalle en un artículo posterior (Grimes et al., 2010) y que se evalúa en la primera de las publicaciones que avalan la presente tesis.

Aparte de los hallazgos embriológicos, moleculares y paleontológicos que se han mencionado en el capítulo anterior dedicado a los antecedentes de la tesis, uno de los puntos que hay que subrayar, en cuanto se refiere al origen ontogenético y evolutivo del tracto de salida cardíaco, es la existencia de una región embrionaria denominada campo cardiogénico secundario (*secondary* o *second heart field*). Se trata de un territorio de mesodermo espláncnico hipofaríngeo que, junto con la cresta neural, contribuye a la formación de la porción de salida del corazón en aves y mamíferos (Kelly et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001, 2005; Kelly et al., 2001; Kelly y Buckingham, 2002; Abu-Issa et al., 2004, 2007; Buckingham et al., 2005; Zaffran et al., 2005; Kelly,

2005, 2012; Moorman et al. 2007; Black, 2007). El campo cardiogénico secundario se ha detectado también en reptiles (Poelmann et al., 2017), anfibios (Brade et al., 2007; Lee y Saint Jeanner, 2011) y teleósteos (Zhou et al., 2011; Hami et al., 2011). En estos últimos, concretamente en *D. rerio*, da lugar al tracto de salida cardíaco y a gran parte del ventrículo (Zhou et al., 2011). En este contexto hay que resaltar que, por el momento, no se ha descrito un campo cardiogénico secundario en condricios. Se ignora, por tanto, lo que dicho campo, cuya presencia es presumible, pueda realizar en los peces cartilagosos.

La averiguación del origen evolutivo de los componentes del tracto de salida del corazón de los gnatostomados pasa forzosamente por la consideración de dicha región en los agnatos, es decir en mixines y lampreas (Fig. 4 dendrograma). Sobre este punto han existido y siguen existiendo opiniones muy controvertidas que, como se verá más adelante, permiten intuir, pero no asegurar taxativamente cuándo apareció cada componente a lo largo de la evolución.

Sobre la base de los antecedentes expuestos anteriormente y de las cuestiones que se acaban de plantear, se formularon los objetivos del primero de los trabajos que integran la presente tesis. En líneas generales, el trabajo debía incluir una revisión crítica de los conceptos que se han sucedido a lo largo de más de dos siglos sobre los componentes del tracto de salida del corazón de los condricios y los actinopterigios. La revisión debía contemplar los hallazgos anatómicos, histológicos, embriológicos, moleculares y paleontológicos que habían conducido al estado actual de la cuestión. Una de las principales conclusiones a las que se pretendía llegar se refería a cuáles son realmente los componentes del tracto de salida en los embriones y adultos de los diversos grandes grupos de condricios y actinopterigios. En relación con ello, se aspiraba a poder proponer una nomenclatura de tales componentes que reflejase sus respectivos orígenes evolutivos y que, así, facilitase el establecimiento de homologías con respecto a los elementos que conforman el tracto de salida cardíaco de los dipnoos, crossopterigios y tetrápodos. Para vislumbrar el origen evolutivo de los componentes del tracto de salida cardíaco de los gnatostomados era necesario revisar los conocimientos existentes sobre esta cuestión en los agnatos. Para inferir las homologías de dichos componentes en el contexto de los condricios y actinopterigios había que valorar la información existente sobre sus respectivas ontogenias. Como consecuencia de estas revisiones surgió la idea de proponer un posible diseño anatómico del corazón primitivo de los gnatostomados. La conclusión a

la que se llegó aporta novedades conceptuales, ante todo sobre la configuración primitiva de la región de salida del corazón, es decir, del ventrículo y del tracto de salida.

Al revisar la extensa bibliografía sobre el tracto de salida cardiaco de los peces salieron a la luz diversas cuestiones que constituían lagunas en el entramado de la información existente sobre el tema. Entre ellas había tres que eran abordables desde el punto de vista empírico y que son las que han dado lugar a los otros artículos que avalan la presente tesis.

La primera de estas cuestiones concierne al bulbo arterioso de los holocéfalos (Fig. 4 dendrograma). Como se ha expuesto anteriormente, la presencia de un bulbo en los condrictios se había constatado por varios autores. No obstante, los datos se referían principalmente a elasmobranquios. La existencia de un bulbo en los holocéfalos, que son el grupo hermano de los elasmobranquios (Didier, 2004; Lund y Grogan, 1997; Grogan y Lund, 2004; Inoue et al., 2010), se había apuntado (Durán et al., 2008, 2010; Grimes et al., 2010), pero no estudiado a fondo. La importancia del tema residía en que la constatación empírica de tal existencia iba a verificar, sino contradecir, la hipótesis de que el bulbo arterioso es realmente un componente del tracto de salida cardiaco de todos los condrictios

La segunda cuestión se refiere a las válvulas del cono arterioso (válvulas conales) de los condrictios. El interés por dichas válvulas se remonta al siglo XIX (Gegenbaur, 1866, 1891, Stöhr, 1876). Desde entonces muchos autores las investigaron, pero solo desde el punto de vista de su anatomía externa. El objetivo principal residía en conocer cuántas válvulas tenía cada especie, cuál era su forma y cómo se distribuían a lo largo del cono (revisado en Sans-Coma, 1995). Estos últimos autores fueron los únicos que estudiaron las válvulas conales desde la perspectiva estructural, histomorfológica, concretamente en una especie de elasmobranquio, *S. canicula*. Desde entonces no había aparecido ninguna publicación sobre el tema, lo cual daba lugar a un vacío muy considerable. Ante esta realidad, se decidió realizar un estudio de las válvulas conales de un batoideo, *R. asterias*, que es una especie relativamente alejada de *S. canicula*, desde el punto filogenético. Al margen de incrementar los conocimientos sobre el tema, los resultados obtenidos aportaron novedades, ante todo sobre la relación morfológica entre el cono y el bulbo.

La tercera cuestión atañe al tracto de salida cardiaco de los teleósteos. El gran desarrollo en ellos del bulbo arterioso en detrimento del cono arterioso ha sido la causa de que la mayor parte de estudios se hayan centrado en la parte no miocárdica del tracto de

salida, especialmente de los teleósteos modernos (revisado en Santer, 1985, e Icardo 2012). El cono ha despertado mucho menos interés (Icardo 2006). Sin embargo, el hecho de que en algunas especies de elopomorfos, que son los teleósteos vivientes más antiguos, haya un cono arterioso con dos filas transversales de válvulas (Senior, 1907 a,b,c), invitaba a indagar cómo es el tracto de salida cardíaco en otro de los grupos de mayor antigüedad, concretamente los osteoglosomorfos (Fig. 4). Sobre esta base, se planteó el estudio del tracto de salida cardíaco de *O. bicirrhosum* que dio lugar a la cuarta publicación que avala la tesis.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Los objetivos que se enuncian a continuación de manera sucinta se han formulado según el orden en el que se exponen las cuatro publicaciones que avalan la tesis. Son los siguientes:

1. Realizar una revisión histórica de los principales conceptos sobre la morfología del tracto de salida del corazón de los condriictios y actinopterigios, desde principios del siglo XIX hasta la actualidad, y ello con el propósito de (1) precisar las características estructurales de los componentes anatómicos que integran esta región cardiaca, (2) dilucidar el origen ontogenético y evolutivo de dichos componentes, y (3) argumentar una nomenclatura de los componentes basada en sus homologías. A ello hay que añadir el intento de inferir cómo debió ser el diseño del corazón primitivo de los vertebrados con mandíbulas (gnatostomados).
2. Llevar a cabo un estudio anatómico, histoquímico y morfométrico del tracto de salida del corazón de los holocéfalos con el propósito de averiguar en qué medida dicha región cardiaca se asemeja a la de su grupo hermano, los elasmobranquios. La idea consistía en comprobar si la composición del tracto de salida cardiaco de los elasmobranquios es común a todos los condriictios y, por ende, es interpretable como la condición primitiva en los gnatostomados
3. Efectuar un estudio anatómico e histomorfológico de las válvulas del cono arterioso de una especie de batoideo y comparar, desde una perspectiva actualizada, los datos obtenidos con los existentes sobre condriictios que son relativamente antiguos y se refieren a una sola especie de tiburón.
4. Realizar una investigación sobre la anatomía e histomorfolología del tracto de salida cardiaco de una especie perteneciente a los osteoglosomorfos que, con los elopomorfos, son los teleósteos actuales de mayor antigüedad. La finalidad del estudio consistió en obtener información que pudiera contribuir a una mejor comprensión de la evolución que experimentó la citada región cardiaca en los teleósteos.

IV. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES

IV. RESÚMENES DE LAS PUBLICACIONES

Publicación 1

The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians

Los componentes anatómicos del tracto de salida cardiaco de condriictios y actinopterigios

Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Cristina Rodríguez, Borja Fernández, Ana C. Durán, Valentín Sans-Coma

Biological Reviews (2018) Aug;93(3):1604-1619 doi: 10.1111/brv.12411

El artículo contiene una revisión sobre el tema que se enuncia en el título, así como una serie de valoraciones críticas y de proposiciones cuya finalidad consiste en contribuir a clarificar varias de las cuestiones relevantes que son aún motivo de controversia. En los apartados precedentes se ha explicado cómo se llegó a la formulación de los objetivos de este trabajo. El primero de ellos consistió en compendiar las diversas nociones sobre la composición del tracto de salida cardiaco de los condriictios y actinopterigios que se generaron durante los dos siglos pasados. Dicho compendio ha quedado expuesto en el apartado de antecedentes, incluso con mayor información que la incluida en el propio artículo publicado. En consecuencia y con el fin de evitar repeticiones, se ha decidido obviar este aspecto en el presente resumen.

Los principales acontecimientos que se han producido durante las dos últimas décadas se han esbozado también en el apartado de antecedentes con el propósito de situar la cuestión en el contexto actual. Sin embargo, en el artículo, tales eventos se analizan desde una perspectiva crítica, como se resume a continuación.

Al iniciarse el presente siglo, se asumía que el tracto de salida cardiaco de los condriictios y de los actinopterigios antiguos (polipteriformes, acipenseriformes y lepisosteiformes) estaba formado por un único componente, el cono arterioso, de paredes miocárdicas y con válvulas en su cara luminal. Solamente en los amiiformes se había descrito la presencia de un componente intrapericárdico, carente de miocardio, que conectaba el ventrículo con la aorta ventral. Dicho componente se interpretaba como el precursor del bulbo arterioso, típico de los teleosteos. En estos últimos, el cono de los

adultos se había reducido de tamaño, hasta convertirse en un elemento vestigial que, en algunas especies, incluso había llegado a desaparecer.

Los trabajos que iban a cambiar notablemente el panorama no se efectuaron siguiendo un esquema filogenético. Los primeros datos que denotaron la existencia de un bulbo arterioso en actinopterigios antiguos, aparte de los amiiformes, se obtuvieron en una especie, *A. naccarii*, perteneciente a los acipenseriformes (Icardo et al. 2002 a,b; Guerrero et al., 2004). A estas investigaciones les siguieron las que se llevaron a cabo en *G. atlanticus*, es decir en un condricio del grupo de los elasmobranquios (Durán et al. 2008; Rodríguez et al., 20013). En los adultos de ambas especies se constató que, entre el cono arterioso y la aorta ventral, hay una porción intrapericárdica, distal, del tracto de salida cardiaco que carece de miocárdico. Los elementos estructurales principales de dicho componente son propios de una arteria; se trata de musculatura lisa, elastina, colágeno y glucosaminoglucanos. Sin embargo, su disposición espacial es distinta a la que se observa en la aorta ventral. Además, a diferencia de la aorta, el componente distal está cubierto por epicardio y recorrido longitudinalmente por los troncos arteriales coronarios, que penetran en él por el límite anterior de la cavidad pericárdica y que, posteriormente, prosiguen su camino a lo largo del cono arterioso.

La determinación de la identidad del componente no miocárdico del tracto de salida cardiaco de *A. naccarii* y *G. atlanticus* llegó de la mano de los estudios realizados en embriones de estas mismas especies (Guerrero et. al, 2004; Rodríguez et al. 2013). En ambas especies, dicho componente se desarrolla después de que se haya diferenciado la aorta ventral, para situarse entre ella y el cono arterioso. El componente distal no es, por tanto, una prolongación caudal de la aorta ventral dentro de la cavidad pericárdica, sino un elemento anatómico con entidad propia.

La embriogénesis del componente distal de *A. naccarii* y de *G. atlanticus* sigue los mismos pasos. En las fases tempranas del desarrollo cardiaco, todo el tracto de salida cardiaco, desde el ventrículo hasta el límite anterior de la cavidad pericárdica, es de naturaleza miocárdica. Así lo evidencia su inmunoreactividad positiva frente al anticuerpo monoclonal MF20, que detecta todas las isoformas de la cadena pesada de miosina sarcomérica. Seguidamente, la porción distal del tracto de salida pierde su carácter miocárdico debido a la aparición de un segmento nuevo, distinto de la aorta ventral. Dicho segmento se desarrolla entre la aorta y la porción miocárdica del tracto de salida, precursora del cono arterioso que se desplaza en sentido cráneo-caudal (Grimes et al., 2006). Las paredes de este nuevo segmento se forman a partir del ingreso de células

mesenquimáticas localizadas en el borde del pericardio, a diferencia de las paredes de la aorta ventral que, en todos los vertebrados, se forma por acreción de células alrededor de un tubo endotelial. Al tiempo que se desarrollan las válvulas en el cono arterioso embrionario, el nuevo segmento, no miocárdico, adquiere su estructura caracterizada por la presencia de musculatura lisa y elastina. La maduración histológica del segmento no se alcanza hasta después de eclosionar el huevo. El proceso embrionario por el cual se forma la porción no miocárdica del tracto de salida de *A. naccarii* y de *G. atlanticus* es prácticamente idéntico al que, como ya se sabía (Hu et al., 2000), da lugar al bulbo arterioso del teleósteo *D. rerio* en cuya composición histológica también son elementos clave la musculatura lisa y la elastina. Cierto es que existen diferencias entre las tres especies, pero son de índole temporal. Los mecanismos morfogénéticos que generan las partes miocárdica y no miocárdica del tracto de salida son iguales en todas ellas. Esta constatación embriológica es la que sustenta la idea de que el componente no miocárdico de los condricios y actinopterigios antiguos es homólogo al bulbo arterioso de los teleósteos (Guerreo et al., 2004; Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2013). Por ello parece razonable utilizar el antiguo término bulbo arterioso para nombrar no solo el componente no miocárdico del tracto de salida cardíaco de los teleósteos, como propuso en su día Gegenbaur (1866, 1891, 1901), sino para designar este mismo componente en todos los peces, tanto cartilaginosos como óseos con aletas radiadas. En este contexto, hay que indicar que la existencia de bulbo arterioso se ha constatado en una amplia serie de condricios (Durán et al., 2010; Borucinska et al., 2012; Rodríguez et al., 2016), en polipteriformes (Durán et al. 2014) y en lepisosteiformes (Grimes 2015).

La sugerencia de que el bulbo arterioso es un componente del tracto de salida cardíaco común a todos los condricios y actinopterigios ha sido rebatida recientemente por Moriyama et al. (2016) basándose en sus hallazgos en *D. rerio* que se han expuesto en el apartado de antecedentes. Los autores consideran que el bulbo es una novedad evolutiva de los teleósteos; es más, afirman que se trata de un órgano nuevo. Uno de los puntos en los que fundamentan esta afirmación es que el bulbo de los teleósteos se compone principalmente de musculatura lisa y elastina, mientras que el tracto de salida cardíaco de los demás vertebrados es de tipo miocárdico. Moriyama et al. (2016) hacen referencia a publicaciones anteriores a la suya, indicando específicamente que el hecho de que la porción no miocárdica del tracto de salida cardíaco de los elasmobranquios esté cubierta por el epicardio y recorrida por los troncos arteriales coronarios no justifica su homología con el bulbo de los teleósteos. Asimismo, recalcan que esta presunta

homología no hace más que crear una notable confusión en la terminología que se utiliza para describir los componentes del tracto de salida del corazón de los peces.

Al margen del interés que tienen los hallazgos de Moriyama et al. (2016) para comprender la evolución del corazón de los peces, concretamente de los teleósteos, hay aspectos de sus conclusiones que son criticables. Moriyama et al. (2016) parecen ignorar que, en los condriccios y actinopterigios antiguos, el segmento intrapericárdico que conecta el cono arterioso con la aorta ventral está compuesto principalmente por musculatura lisa y elastina (figuras 2 y 3 del artículo), al igual que el bulbo arterioso de los teleósteos. Además, no tienen en cuenta que, en muchas especies de teleósteos, los adultos poseen un cono arterioso (Icardo, 2006, 2012, 2017), aunque, en ciertos casos, sea de pequeño tamaño (figuras 4 y 5 del artículo). Además, Moriyama et al. (2016) no consideran el hecho de que la secuencia morfogénica que conduce a la formación del tracto de salida cardiaco es igual en condriccios, actinopterigios antiguos y teleósteos, a saber, diferenciación del miocardio conal e incorporación de mesénquima mesodérmico extracardiaco y su diferenciación en un bulbo elástico con musculatura lisa. Así, pues, todo sugiere que el cono y el bulbo existen en todos los peces cartilagosos y peces óseos con aletas radiadas: En otras palabras, el bulbo arterioso no es exclusivo de los teleósteos.

Otros aspectos de las conclusiones de Moriyama et al. (2016) que no es posible compartir es que el bulbo arterioso de los teleósteos sea un órgano nuevo. Puede tratarse de una novedad evolutiva, pero no de un órgano. En caso contrario, el seno venoso, el atrio, el ventrículo y otros componentes cardiacos más deberían considerarse órganos, lo cual no parece justificable en absoluto.

Según Moriyama et al. (2016) el uso del término bulbo arterioso para designar el componente no miocárdico del tracto de salida cardiaco de condriccios y actinopterigios no teleósteos induce a confusión. Sin embargo, como se acaba de razonar, su punto de vista, basado solamente en datos moleculares, no se sostiene si se atiende a la morfología, histología y embriología de dicho componente. Por más que en él se haya generado una novedad molecular, la elastina b, el bulbo sigue siendo bulbo como tal. Por ello, la proposición que consta en el artículo que se compendia aquí es la de mantener los términos cono arterioso y bulbo arterioso para referirse, respectivamente, a los componentes miocárdico y no miocárdico del tracto de salida del corazón, tanto de condriccios como de actinopterigios.

En un estudio realizado en especies de varios grupos de vertebrados, Grimes et al. (2010) constataron que, en todas, cabe distinguir tres componentes histomorfológicos en

el tracto de salida cardiaco: distal, medio y proximal. El distal carece de miocardio; su musculatura es de tipo liso. El proximal solo tiene musculatura miocárdica. En el componente medio, el miocardio y la musculatura lisa se superponen. El interés de este patrón reside en que aparentemente es común a todos los vertebrados. Sin embargo, para identificar los tres componentes hay que recurrir a técnicas microscópicas. En este contexto, hay que precisar que, atendiendo a la presencia versus ausencia de miocardio, el componente distal se corresponde con el bulbo arterioso, mientras que el medio y el proximal integran, conjuntamente, el cono arterioso. En todo caso, independientemente de los parámetros anatómicos que se quieran emplear para determinar los límites de los componentes del tracto de salida, la realidad es que el bulbo arterioso y el cono arterioso se superponen desde el punto de vista histológico.

La embriogénesis del tracto de salida cardiaco de condrictios y actinopterigios se ha resumido en párrafos anteriores, concluyendo que, en ambos grupos, tiene lugar según un patrón semejante, lo cual apoya la idea de que, en ellos, el cono, por una parte, y el bulbo, por otra, son componentes homólogos. Como también se ha expuesto, hay claras evidencias de que, en teleósteos, todo el tracto de salida es un derivado del campo cardiogénico secundario (Zhou et al., 2011). En cambio, se desconoce si esto ocurre también en condrictios y actinopterigios antiguos, ya que, en ellos, no se ha encontrado, por el momento, dicho campo cardiogénico.

En relación con esta cuestión, hay que anotar que se han detectado precursores cardiofaríngeos pluripotentes en la ascidia *Ciona intestinalis* (Stolfi et al., 2010), que es un representante de los antecesores más inmediatos de los vertebrados. Además, se han identificado determinantes moleculares del campo cardiogénico secundario, propios de los vertebrados, en embriones de ascidias (Diogo et al., 2015). Asimismo, estudios moleculares realizados en la lamprea *Lethenteron japonicum* indican que, en esta especie, existen células homólogas a las células progenitoras del campo cardiogénico secundario (Kokubo et al., 2010). Estos hallazgos en urocordados y agnatos sugieren que dicha estructura embrionaria debe estar presente en todos los gnatostomados y, por ende, en los condrictios.

Para elucidar el origen evolutivo del bulbo arterioso y del cono arterioso es necesario considerar la morfología de la unión cardiaco-aórtica en los agnatos, es decir, en mixiniiformes y petromomizontiformes. En relación con ello hay que tener en cuenta que el corazón de los mixines tiene caracteres más primitivos que el de las lampreas (revisado en Kardong, 2002; Grimes & Kirby, 2009) y que las referencias bibliográficas

sobre el tracto de salida de estos animales es muy controvertida. En el artículo que se resume aquí se han comparado los puntos de vista expresados por diferentes autores y se ha concluido lo siguiente.

Aunque en los mixines y lampreas adultos no se ha detectado un cono arterioso como tal, el hecho de que en ambos casos haya válvulas de salida induce a pensar que sí debe existir en ellos un cono, al menos embrionario. De ser así, cabe la posibilidad de que en los antecesores de los agnatos actuales quizá hubiese un cono arterioso patente en los adultos que, al igual que en los teleósteos, se redujo a lo largo de la evolución. Hay datos genéticos obtenidos en lampreas (Kokubo *et al.*, 2010) que apoyan la idea de que el cono debió originarse antes de aparecer los gnatostomados.

El caso del bulbo arterioso es más complejo, entre otros motivos porque los agnatos carecen de elastina. En el corazón y en la aorta ventral tienen microfibrillas que parecen ejercer una función similar a la de la elastina (Wright, 1984). Al margen de ello, no parece existir un elemento semejante al bulbo de los gnatostomados, ni en mixines ni en lampreas (revisado en Moorman y Christoffels, 2003, y Grimes y Kirby, 2009). En suma, resulta bastante dudoso que el bulbo arterioso se originara en una etapa evolutiva previa a los gnatostomados.

El último tema que se trata en el artículo se refiere al posible diseño anatómico del corazón primitivo de los gnatostomados. Para enfocar la cuestión había que basarse en algún modelo de los que hay en la actualidad. Ciertamente es que Maldanis *et al.* (2016) demostraron que la fosilización de un corazón es posible, pero, salvo su hallazgo en un teleósteo, no hay otro dato paleontológico en que basarse. Por este motivo, se pensó que la mejor vía consistía en remitirse a los grupos de vertebrados mandibulados vivientes de mayor antigüedad. Tras una ponderación de las diferentes opiniones que constan en la bibliografía, se llegó a la conclusión de que los condriictios constituyen el clado actual más ancestral (Inoue *et al.*, 2003; Meyer & Zardoya, 2003; Takezaki *et al.*, 2003; Blair & Hedges, 2005). Los condriictios divergieron de los osteíctios a principios del Silúrico, antes de la división de estos últimos en actinopterigios y sarcopterigios (Takezaki *et al.*, 2003; Blair y Hedges, 2005; Benton *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Así pues, parece parsimonioso admitir que el diseño del corazón de los peces cartilaginosos actuales es el que más se asemeja al modelo anatómico primitivo.

Sobre esta base se puede inferir que el corazón primitivo de los gnatostomados (figura 6 del artículo) estaba formado por (1) un seno venoso que contenía el marcapasos (Jensen *et al.*, 2004), (2) un atrio con miocardio trabeculado, (3) una región

atrioventricular que soportaba las válvulas atrioventriculares, (4) un ventrículo con miocardio de tipo mixto, (5) un cono arterioso con miocardio de tipo compacto y válvulas (válvulas conales) en su cara luminal y (6) un bulbo arterioso, no-miocardico, compuesto principalmente por musculatura lisa y elastina, que conectaba el cono arterioso con la aorta ventral.

El que el ventrículo tuviese presuntamente miocardio de tipo mixto precisa una explicación. El ventrículo de los peces varía notablemente entre las especies en función de la histomorfología del miocardio. No obstante es posible distinguir dos grandes patrones, el miocardio esponjoso o trabeculado y el miocardio mixto (Tota et al., 1983; Santer, 1985; Tota, 1989; Davie y Farrell, 1991; Farrell et al., 2012). El miocardio trabeculado (figura 7 del artículo) está formado exclusivamente por trabéculas miocárdicas (capa esponjosa) y se nutre a base de la sangre pobre en oxígeno que circula a través del corazón. El miocardio mixto (figura 7B del artículo) se compone de dos capas, una interna, la esponjosa, y otra externa, la compacta, constituida por miocardio compacto (revisado en Grimes y Kirby, 2009). El miocardio mixto se nutre a través de un sistema arterial coronario, más o menos desarrollado según las especies. Las relaciones entre los dos tipos principales de miocardio y la fisiología del corazón han sido objeto de numerosos estudios (Santer y Greer Walker, 1980; Tota et al., 1983; Santer, 1985; Tota, 1989; Davie y Farrell, 1991; Farrell et al., 2012; Durán et al., 2015; Cox et al., 2016).

Hasta hace poco tiempo se venía asumiendo que el ventrículo del corazón primitivo de los vertebrados poseía exclusivamente miocardio trabeculado y que el miocardio mixto había aparecido, de forma independiente, en muchos grupos de peces durante la evolución (revisado en Durán et al., 2015). Sin embargo, un estudio reciente llevado a cabo en holocéfalos (Durán et al., 2015) ha rebatido esta suposición, avalando, por contra, la sugerencia de Farrell et al. (2012) de que el miocardio mixto con arterias coronarias nutriendo las capas compacta y esponjosa, como ocurre en los condriactos, fue la condición primitiva en los gnatostomados. Sobre esta base, la ausencia de capa compacta y sistema arterial coronario en diferentes grupos de actinopterigios ha de interpretarse como resultado de su pérdida reiterada durante la evolución.

Los mixines y las lampreas tienen un ventrículo con miocardio trabeculado avascular (Randall y Davie, 1980; Farrell, 2007; Icardo et al., 2016). Este hecho siembra dudas acerca de la proposición de que el miocardio mixto sea el estado primitivo en los gnatostomados; pero, la solución de este dilema no puede ser más que especulativa, ya que probablemente la condición del miocardio ventricular en el antecesor común de los

agnatos y los gnatostomados no llegará a conocerse (Durán et al., 2015). No obstante, caben dos posibilidades. La primera es que el antecesor común, que presumiblemente fue más complejo de lo que se sospechaba hasta hace poco tiempo (Heimberg et al., 2010), tuviese un ventrículo con miocardio mixto y que los mixines y las lampreas actuales hubiesen perdido la capa compacta. La segunda posibilidad es que en los agnatos solo hubiese existido miocardio trabeculado, lo cual supondría que el miocardio mixto es una apomorfía de los gnatostomados.

Publicación 2

The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance

El bulbo arterioso del corazón de los holocéfalos: anatomía macroscópica, histomorfología, pigmentación y significado evolutivo

Cristina Rodríguez, Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Borja Fernández, Francisca Salmerón, Valentín Sans-Coma, Ana C. Durán

Zoology (2017), 123: 37–45

Cuando se planteó el presente estudio, se sabía que el tracto de salida del corazón de los elasmobranquios está formado por un cono arterioso y un bulbo arterioso y se había formulado la hipótesis de que esta disposición anatómica pudiera ser la primitiva en los vertebrados gnatostomados (Durán et al., 2008). Faltaba conocer si el bulbo arterioso existe también en los holocéfalos, que, como se ha indicado en apartados precedentes, son el grupo hermano de los elasmobranquios. Existe el consenso de que ambos clados compartieron un antepasado paleozoico, cuya identidad aún se desconoce (Didier, 2004; Lund y Grogan, 1997; Grogan y Lund, 2004; Inoue et al., 2010). La información sobre la anatomía del corazón de los holocéfalos era escasa, pero sí se había indicado brevemente que en la parte anterior del tracto de salida cardiaco de *Chimaera monstrosa* hay un segmento que podría ser morfológicamente equivalente al bulbo arterioso de los elasmobranquios (Durán et al., 2008, 2010; Grimes et al., 2010).

Partiendo de estos antecedentes, se estudiaron los corazones de un total de 16 individuos adultos pertenecientes a cuatro especies distintas, dos de ellas, *C. monstrosa* (n=10) e *Hydrolagus affinis* (n=2), de la familia Chimaeridae y las otras dos, *Harriotta raleighana* (n=2) y *Rhinochimaera atlantica* (n=2), de la familia Rhinochimaeride.

Quince corazones se examinaron mediante técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas para microscopía óptica. El restante, que era de *C. monstrosa*, fue incubado, antes de su fijación, en un indicador fluorescente de óxido nítrico (NO), el 4,5-diaminofluoresceína 2-diacetato (DAF-2DA), que se usa como marcador de musculatura lisa prospectiva (Grimes et al., 2006). Seguidamente, la pieza se procesó para microscopía óptica con epifluorescencia.

Resumen de los resultados

En las cuatro especies, el ventrículo tenía forma piramidal. De él partía el tracto de salida cardiaco, en el que se distinguían dos componentes tubulares, proximal y distal (figuras 1A-D del artículo). El proximal era más ancho y de paredes más consistentes que el distal. La longitud de este último con respecto a la total del tracto de salida era similar en las cuatro especies; oscilaba entre el 19% y el 23%, según los individuos.

En el componente proximal había dos hileras transversales de válvulas, cada una, con tres o cuatro válvulas (figura 1E del artículo). La pared del componente estaba constituida por tres capas histológicas (figura 1F del artículo), una interna, delgada, formada por el endocardio y un subendocardio de naturaleza fibrosa, la media, gruesa y de estructura miocárdica, y la externa, integrada por el epicardio y un subepicardio de tipo fibroso.

El componente distal carecía de válvulas (figuras 1E,F del artículo). Estaba tapizado internamente por el endocardio y recubierto externamente por el epicardio (figura 2A del artículo). La gruesa capa situada entre el endocardio y el epicardio estaba compuesta principalmente por musculatura lisa, elastina y colágeno (figuras 2B-F del artículo).

Dos troncos arteriales coronarios, procedentes de las arterias hipobranquiales, penetraban en el tracto de salida cardiaco justo en el límite anterior de la cavidad pericárdica. A partir de este punto, los troncos cursaban longitudinalmente por la capa externa de la pared del componente distal (figuras 2A, C-E del artículo) y por el subepicardio del componente proximal hasta alcanzar la unión de este último con el ventrículo. Ambos troncos arteriales emitían ramas que irrigaban ambos componentes, proximal y distal.

La aorta ventral, situada fuera de la cavidad pericárdica, era de menor calibre que el componente distal y tenía la estructura propia de una arteria elástica. Estaba formada por tres capas, íntima, media y adventicia (figuras 3A-D del artículo). La media estaba compuesta por células musculares lisas, separadas por fibras elásticas y escasas fibras de colágeno.

De forma insospechada, el examen de los corazones dio lugar a un hallazgo que supuso una novedad en el ámbito de los condrictios. El corazón de los diez ejemplares de *C. monstrosa* estaba pigmentado en mayor o menor grado. De las demás especies, solamente un ejemplar de *R. atlántica* tenía células pigmentadas, concretamente en la parte distal del tracto de salida cardiaco.

En *C. monstrosa* se detectó pigmentación en todas las regiones cardíacas, pero de forma variable según los individuos. El seno venoso estaba pigmentado en ocho de ellos, el atrio en siete, el ventrículo en siete y el tracto de salida en diez (figuras 4A-M del artículo). Estos hallazgos, según el sexo y el tamaño de los animales, constan en la tabla 1 del artículo. En el seno venoso, en el atrio y en el ventrículo, la pigmentación era dispersa (figuras 4A-C del artículo). En cambio, el tracto de salida cardíaco sí presentaba una cantidad notable de células pigmentadas. Tan solo en un ejemplar, la pigmentación se limitaba a la porción más distal del tracto de salida. Los otros nueve presentaban patrones de pigmentación distintos, pero, en todos los casos, el área de pigmentación era mayor en la zona dorsal que en la ventral (figuras 4D-M del artículo).

Las células pigmentadas se localizaban en el subepicardio (figura 5 del artículo) y se distinguían bien, tanto en las secciones histológicas sin teñir como en las teñidas. Las células eran alargadas y se disponían en pequeños grupos, algunos de los cuales rodeaban las arterias y las venas del tracto de salida cardíaco.

Resumen de la discusión

Los presentes resultados anatómicos e histológicos demuestran que el tracto de salida cardíaco de los holocéfalos consta de dos componentes, el proximal y el distal. El proximal, de paredes miocárdicas y con válvulas en su parte interna, es, sin duda, el cono arterioso. El componente distal carece de miocardio y de válvulas. Sus paredes tienen una estructura histológica semejante a la de una arteria elástica. Sin embargo, las capas de elastina, musculatura lisa y colágeno son manifiestamente más gruesas que las de la aorta ventral. Como consecuencia de ello, el componente distal es de mayor diámetro que la aorta. Además, a diferencia de esta última, el componente distal está cubierto por el epicardio y está recorrido por los troncos arteriales coronarios, que no son meros *vasa vasorum*.

Las características del componente distal, que lo diferencian del cono arterioso y de la aorta ventral, son muy semejantes a las del bulbo arterioso del elasmobranquio *G. atlanticus* (Durán et al. 2008). De ello se deduce que los holocéfalos tienen el tracto de salida cardíaco formado por un cono arterioso y un bulbo arterioso. Sin embargo, esta afirmación hay que matizarla. Los datos obtenidos se refieren a especies pertenecientes a dos de las tres familias actuales de holocéfalos. Sobre el tracto de salida cardíaco de los callorínquidos, que son el grupo hermano del clado integrado por los quiméridos y los rinoquiméridos (Inoue et al., 2010), no hay, por ahora, ninguna información. Cierto es

que si el bulbo arterioso existe en las dos familias incluidas en el presente estudio y en los elasmobranquios, resulta parsimonioso suponer que también está presente en los callorínquidos, pero esta cuestión queda pendiente de una futura demostración empírica.

En el presente artículo se argumenta el significado evolutivo de la presencia de un bulbo arterioso en los holocéfalos. Las conclusiones a las que se llega, que refrendan la idea de que el cono y el bulbo existen desde el inicio de la radiación evolutiva de los gnatostomados, están incorporadas al primero de los cuatro artículos que conforman la presente tesis. Por ello, se ha decidido obviar aquí el tema en cuestión. No obstante, sí merece mencionarse que, en la publicación sobre los holocéfalos, se hace hincapié en la importancia que tiene el hallazgo del bulbo en estos animales y en los demás condriictios para comprender mejor la evolución del tracto de salida cardiaco en los sarcopterigios. Baste con recordar que en *Latimeria chalumnae* dicha región cardiaca está formada por un cono arterioso y un bulbo arterioso (Anthony et al., 1965) y que hay datos que sugieren que el bulbo arterioso de los peces es homólogo a las porciones intrapericárdicas de la aorta y de la arteria pulmonar de aves y mamíferos (Grimes, et al., 2006).

Sobre la base de la revisión bibliográfica que consta en el artículo, éste parece ser el primero en el que se describe la presencia de células pigmentadas en corazones de condriictio. La similitud de estas células con las encontradas por Reyes-Moya et al. (2014) en el corazón de *Polypterus senegalus* induce a pensar que el pigmento era melanina. Las células pigmentadas abundaban particularmente en el tracto de salida, pero se presentaban también en cualquiera de los demás grandes segmentos del corazón y ello con independencia del sexo y del tamaño de los animales.

La función de las células pigmentadas en el corazón de los peces se desconoce. A tenor de la información existente sobre melanocitos y melanóforos en general y sobre la acción de dichas células en corazones de anfibios, aves y mamíferos, se ha formulado la hipótesis siguiente. Pudiera ser que en el corazón de los peces existieran células que, aun siendo del mismo linaje que los melanocitos, no sintetizaran melanina y que tales células ejercieran una función inmunitaria similar a la de los melanocitos tegumentarios.

En el artículo se argumenta que las células pigmentadas detectadas en el corazón de los holocéfalos posiblemente deriven de la cresta neural. Si ello llegara a confirmarse, el presente hallazgo supondría que, en el corazón primitivo de los gnatostomados, la cresta neural puebla un territorio cardiaco mucho más amplio de lo que se ha supuesto hasta la actualidad, cuando menos a nivel subepicárdico.

Publicación 3

The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes)

Las válvulas del tracto de salida cardiaco de la raya estrellada, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes)

Miguel Lorenzale, Borja Fernández, Ana C. Durán, Miguel A. López-Unzu, Valentín Sans-Coma.

Anatomia Histologia Embryologia (2018) Oct 31. doi: 10.1111/ahe.12409

Las válvulas del tracto de salida cardiaco de los condricios están ubicadas en el cono arterioso; de ahí su denominación de válvulas conales. Su función consiste en impedir el reflujo de sangre hacia el corazón durante la diástole ventricular.

El interés por las válvulas conales de los peces cartilaginosos se remonta al siglo XIX, pero la mayor parte de los estudios realizados se refieren a su cantidad, forma, tamaño y colocación a lo largo del cono, siendo así que todos estos caracteres son muy variables según las especies (Sans-Coma et al., 1995). La información existente sobre la histomorfología de estas válvulas es muy escasa. El único artículo en el que se aborda este tema es el de estos últimos autores, en el cual se describen las válvulas conales del escualo *Scyliorhinus canicula*.

Con el fin de contribuir a un conocimiento más amplio de la estructura de las válvulas conales de los condricios, se planteó el presente estudio que se realizó en una especie de batoideo, *Raja asterias*. La idea que subyacía en dicho planteamiento no se limitaba a aportar nuevos datos anatómicos e histomorfológicos sobre las válvulas conales, sino a revisar algunas de las interpretaciones derivadas del estudio llevado a cabo en la pintarroja, que no parecían concordar con las nociones que se tienen hoy en día sobre la composición del tracto de salida cardiaco en los gnatostomados actuales de mayor antigüedad.

El material de estudio consistió en corazones de un total de siete rayas adultas, todas procedentes del Mediterráneo. Dos de los siete corazones se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido; los cinco restantes a base de técnicas histoquímicas para microscopía óptica.

Resumen de los resultados

Las imágenes de la figura 1 del artículo ilustran los resultados anatómicos que se compendian seguidamente.

El tracto de salida de todas las rayas estudiadas estaba formado por el cono arterioso y el bulbo arterioso. El cono estaba provisto de cuatro hileras transversales de tres válvulas cada una. En cada hilera, las válvulas estaban dispuestas en posición dorsal, dextro-lateral y sinistro-lateral. Las válvulas de la primera hilera eran las de mayor tamaño; las de la segunda hilera eran las menores. Todas las válvulas estaban constituidas por una valva y el seno que la sostenía. La valva era el componente más móvil de la válvula que se abría y cerraba durante el ciclo cardiaco. El seno era la porción hueca de la pared del tracto de salida cuyos bordes sostenían la valva. El borde proximal y los bordes laterales de la valva estaban anclados al seno. El borde distal no se unía al seno; de ahí su denominación de borde libre. Las valvas de todas las válvulas tenían un cuerpo central robusto, cuyo grosor disminuía hacia las partes laterales y hacia el borde libre.

Las válvulas de la hilera anterior estaban ancladas proximalmente al cono arterioso y distalmente al bulbo arterioso. La pared de los senos valvulares de las hileras segunda a cuarta era de naturaleza exclusivamente conal. El aparato valvular presentaba numerosas cuerdas tendinosas que unían unas valvas con otras.

Las imágenes de la figura 2 del artículo ilustran los hallazgos histológicos que se exponen sucintamente a continuación.

La frontera histológica entre el cono arterioso y el bulbo arterioso quedaba fijada por el extremo distal del miocardio conal. El bulbo conectaba con la aorta ventral en el límite anterior de la cavidad pericárdica. En las tres valvas anteriores, el tercio proximal del seno era de naturaleza conal, con miocardio, mientras que los dos tercios distales eran de tejido bulbar. Los senos de las demás válvulas eran enteramente conales.

Cada válvula tenía un núcleo de tejido conjuntivo rodeado por el endocardio. En el cuerpo central de la valva, el tejido estaba dispuesto en tres capas: fibrosa externa, esponjosa y fibrosa interna. Las fibras, compuestas principalmente por colágeno tipo I y III, se unían entre sí en la parte del borde libre. En las partes laterales, derecha e izquierda, de la valva, las fibras también se unían formando una banda que se anclaba al seno. La fibrosa interna dejaba de existir en la parte proximal de la valva, donde ésta se sujetaba ampliamente a la pared del seno. La esponjosa era una capa con abundantes glucosaminoglucanos, que también contenía colágeno, elastina y células con aspecto de fibroblastos.

Resumen de la discusión

En cuanto se refiere al número de válvulas conales, los presentes resultados no difieren sustancialmente de los de Stöhr (1876) y Kisch (1930), obtenidos en sendos estudios generales sobre el cono arterioso de los condrictios. Las únicas diferencias detectadas con respecto a lo que consta en dichos trabajos se refieren al tamaño de las válvulas, pero esta circunstancia no parece ser relevante desde el punto de vista funcional. Se puede afirmar que el patrón valvular, constituido por cuatro hileras transversales de tres válvulas cada una, es el típico de *R. asterias*.

Las valvas de las válvulas conales de *R. asterias* apenas difieren de las de *S. canicula* (Sans-Coma et al., 1995) desde el punto de vista histológico. Las divergencias más notables se refieren al grosor de la esponjosa, que es mayor en la raya estrellada, y a las capas fibrosas, que son más delgadas en esta última especie. Al igual que en *S. canicula* (Sans-Coma et al., 1995), la fibrosa interna y las porciones laterales, fibrosas, de las valvas parecen ser las estructuras que soportan el estrés debido a la presión que genera el reflujo sanguíneo. La expansión de la valva en dirección radial parece depender de la esponjosa, mientras que la rigidez en esta misma dirección debe venir determinada principalmente por la fibrosa externa.

Según Sans-Coma et al (1995), las válvulas conales anteriores de *S. canicula* están ancladas proximalmente al cono arterioso y distalmente a la aorta ventral. En este sentido hay que matizar que, cuando se llevó a cabo dicho trabajo, se desconocía la existencia del bulbo arterioso en los condrictios. Esta circunstancia determinó que la conclusión a la que llegaron los citados autores fuese incorrecta. La realidad, tal como ocurre en *R. asterias*, es que la parte distal de las válvulas anteriores está anclada al bulbo y no a la aorta. Este hecho es importante para comprender los cambios que ha experimentado el aparato valvular a lo largo de la evolución de los vertebrados, ante todo si se asume que los condrictios actuales poseen un corazón, cuyo diseño anatómico refleja la condición primitiva dentro de los gnatostomados (Durán et al., 2008).

Genegenbaur (1866) y Stöhr (1876) ya hicieron hincapié en que la sola hilera de válvulas que hay en el tracto de salida cardiaco de la mayoría de especies de teleósteos equivale a la hilera transversal anterior de válvulas de los condrictios y actinopterigios antiguos. En los teleósteos, las válvulas están ancladas proximalmente al cono arterioso y, distalmente, al bulbo arterioso (Guerrero et al. 2004; Lorenzale et al., 2017). Las aves y los mamíferos poseen normalmente tres válvulas en la base de la aorta y de la arteria pulmonar. Durante siglos y desde la perspectiva médica, estos conjuntos trivalvulares se

han denominado válvula aórtica y válvula pulmonar, respectivamente. La estructura histológica de los senos aórticos y pulmonares no es exactamente igual en todos, pero, en general, poseen una base miocárdica y una porción distal de naturaleza arterial (Hokken et al., 1997; Anderson, 2000). La parte miocárdica deriva del cono o conotruncus embrionario, que, se ha sugerido, es homólogo del cono arterioso de los peces (Guerrero et al., 2004). La parte arterial es morfogénicamente equivalente al bulbo arterioso de los peces (Grimes et al., 2006). De ello cabe deducir que la disposición de las válvulas conales anteriores que se presenta en la raya estrellada se corresponde con un patrón anatómico primitivo que se ha conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados gnatostomados.

Publicación 4

Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes)

*Caracterización anatómica, histoquímica e inmunohistoquímica del tracto de salida cardiaco de la arawana plateada, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes)*

Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, M. Carmen Fernández, Ana C. Durán, Borja Fernández, M. Teresa Soto-Navarrete, Valentín Sans-Coma
Zooology (2017), 120: 15-23

La información existente sobre el bulbo arterioso de los teleósteos es extensa (revisado en Santer, 1985, e Icardo, 2012). En cambio, la referente al cono arterioso es escasa (Schib et al., 2002; Icardo, 2006, 2012; Garofalo et al. 2012), sin duda por la supuesta desaparición de este componente cardiaco en los adultos de muchas especies. Ocurre también que, en su mayoría, los trabajos sobre el tracto de salida cardiaco en teleósteos se han realizado en especies de grupos filogenéticamente modernos, de manera que hay una laguna importante en cuanto a los teleósteos antiguos.

Ante esta situación se planteó un estudio anatómico e histológico del tracto de salida del corazón de *Osteoglossum bicirrhosum* en la que la coexistencia de un cono arterioso con un bulbo arterioso se había mencionado ya, pero sin aportar datos sobre la estructura de dichos componentes (Boas, 1880; Hoyer, 1900; Smith, 1918; Grimes et al., 2010). La especie, que es de agua dulce, pertenece a la familia Osteoglossidae (orden Osteoglossiformes) del grupo monofilético de los osteoglosomorfos (Amemiya et al., 2006). Análisis moleculares relativamente recientes han demostrado que los elopomorfos y los osteoglosomorfos son los clados de mayor antigüedad dentro de los teleósteos (Faircloth et al., 2013).

Se estudiaron los corazones de seis individuos juveniles de una longitud corporal total, medida desde la punta anterior de la cabeza hasta el final de la cola, comprendida entre los 12,0 cm y los 16,5 cm. Los especímenes se examinaron por microscopía electrónica de barrido y técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas para microscopía óptica.

Resumen de los resultados

En visión macroscópica, el corazón de la arawana parecía estar formado por cuatro segmentos, dos de ellos, el seno venoso y el atrio, de posición dorsal con respecto a los otros dos, que eran el ventrículo y el bulbo arterioso (figura 1A del artículo). No había ningún indicio que permitiera intuir la existencia de un cono arterioso. En los seis ejemplares examinados había un vaso sanguíneo prominente que recorría ventralmente el bulbo arterioso, desde el límite anterior de la cavidad pericárdica hasta el ventrículo. Además, en todos ellos, la superficie del bulbo y de la parte anterior del ventrículo estaba pigmentada (figura 1A del artículo).

Al abrir el ventrículo y el bulbo mediante una incisión dorsal, se vio que, entre ellos, había un segmento corto que sostenía dos válvulas, derecha e izquierda. Según se comprobó más tarde, a base de técnicas histológicas, dicho segmento tenía miocardio compacto, a diferencia del ventrículo, cuyo miocardio era exclusivamente esponjoso. Dada su posición entre el ventrículo y el bulbo y dada su naturaleza miocárdica, se consideró que el segmento en cuestión era el cono arterioso (figuras 1B,C del artículo) al que se habían referido los autores citados anteriormente.

Las dos válvulas conales, que tenían forma de bolsillo, estaban formadas, cada una, por una valva y el seno que la soportaba (figura 1B del artículo). Como se aprecia en esta misma figura, la cara interna del bulbo arterioso, incluidos los senos valvulares, presentaba numerosas crestas longitudinales. Aparte de ellas, había dos crestas muy prominentes, una dorsal y otra ventral, que se extendían desde casi la parte más craneal del bulbo hasta los puntos de anclaje distales de cada valva a su correspondiente seno. En dichos puntos de anclaje, las valvas se unían formando dos comisuras, dorsal y ventral.

La aplicación de técnicas histológicas permitió ver que el corazón de la arawana no está formado por cuatro, sino por seis segmentos, a saber, seno venoso, atrio, región atrioventricular, ventrículo, cono arterioso y bulbo arterioso (figura 1C del artículo).

En cuanto se refiere al cono arterioso, las preparaciones histológicas mostraron que su pared posee dos capas fibrosas, externa e interna, ricas en colágeno tipo I (figura 2A del artículo), pero pobres en elastina (figura 2B del artículo). Entre las dos capas fibrosas hay una capa media de miocardio compacto que muestra inmunoreactividad positiva frente a los anticuerpos A4.1025 (figura 2C del artículo) y MF20.

Las características histológicas de las válvulas conales están documentadas en la figura 2 del artículo. De forma compendiada cabe indicar que cada valva consta de un núcleo de tejido conjuntivo cubierto por el endocardio. En la parte central de la valva, el

tejido conjuntivo presenta tres capas, la fibrosa interna, la fibrosa externa y, entre ellas, la esponjosa (figuras 2 D,E del artículo). En ambas fibrosas, el componente principal es el colágeno tipo I (figura 2F del artículo). La esponjosa, más gruesa que las fibrosas, está formada por colágeno tipo III (figura 2F del artículo), glucosaminoglucanos no sulfatados, elastina (figura 2B del artículo) y gran cantidad de células, posiblemente fibroblastos (figuras 2 D,E del artículo). En las comisuras, las crestas bulbares mayores, dorsal y ventral, pierden su condición elástica, dando paso a una banda fibrosa, formada principalmente por colágeno tipo I, a la cual se anclan las porciones distales de las valvas conales (figuras 2 E, F del artículo).

Las características histológicas del bulbo arterioso de la arawana están ilustradas en las figuras 3 y 4 del artículo. El bulbo consta de tres capas: el endocardio, un estrato medio, grueso, de elastina y musculatura lisa, y el epicardio que recubre un subepicardio de tejido conjuntivo. El componente estructural más abundante es la elastina. Las fibras elásticas forman láminas continuas y paralelas, dispuestas en tres capas, interna, media e externa (figuras 3 B, C del artículo). Algunas láminas de la capa interna protruyen hacia el lumen bulbar, formando crestas (figuras 3 B, D del artículo). En cambio, las dos crestas mayores, dorsal y ventral, están constituidas por láminas elásticas procedentes de las capas media e interna (figuras 3 D, E del artículo).

Las células musculares lisas del bulbo (figuras 4 A, B del artículo) alternan con las láminas elásticas. Dichas células también se disponen en tres capas, interna, media y externa (figura 4A del artículo), con orientaciones que coinciden con las de las láminas elásticas.

El subepicardio del bulbo, en el cual se alojan células pigmentadas (figuras 3C, 4D del artículo), está formado principalmente por colágeno tipo I (figura 4C del artículo). La zona ventral del subepicardio bulbar está recorrida por una arteria (figuras 4 A, B, D del artículo), que alcanza la unión cono-bulbar e irriga el miocardio conal.

Resumen de la discusión

Los presentes hallazgos en la arawana, que es un representante de uno de los grupos de teleósteos actuales más antiguos, son un claro testimonio de la reducción en tamaño que ha experimentado el cono arterioso en dicho grupo de actinopterigios desde principios de su radiación evolutiva. Como ocurre en casi todos los teleósteos, el cono arterioso de la arawana tiene una única hilera transversal de válvulas. Tan solo algunos elopomorfos poseen dos hileras (Stannius, 1846; Boas, 1880; Senior, 1907a,b,c). Los

actinopterigios más antiguos tiene más: nueve en polipteriformes (Parsons, 1930; Durán et al., 2014; Grimes, 2015), ocho en lepisosteiformes (Parsons, 1930; Grimes, 2015), de dos a cuatro en acipenseriformes (Stöhr, 1876; Parsons, 1930; Icardo et al., 2002a,b; Grimes, 2015) y 3 en amiiformes (Stöhr, 1876; Parsons, 1930; Grimes, 2015). Por tanto, se puede afirmar que la arawana presenta el diseño primitivo del tracto de salida cardíaco de los teleósteos, con un cono arterioso pequeño, pero distinguible con respecto al ventrículo, y un bulbo arterioso bien desarrollado.

El miocardio del cono arterioso de la arawana es compacto, en tanto que el del ventrículo es esponjoso. Actualmente se cree que el miocardio compacto existió desde la aparición de los gnatostomados, al menos en la porción proximal del tracto de salida cardíaco (Durán et al., 2008; Farrell et al., 2012). Asimismo, se piensa que la condición primitiva del miocardio ventricular de los peces es la del tipo mixto (Durán et al., 2015). De estas premisas cabe inferir que el miocardio compacto del cono de la arawana constituye un carácter conservado desde el punto de vista evolutivo, mientras que el miocardio esponjoso del ventrículo es el producto de una pérdida de la capa compacta del miocardio mixto primitivo.

El cono arterioso de la arawana tiene dos válvulas, derecha e izquierda. En ninguno de los corazones estudiados se encontraron válvulas menores, accesorias, como las descritas en muchas especies de teleósteos (Icardo et al., 2003). La composición histológica de las valvas, que no difiere sustancialmente de las de otras especies, sugiere lo siguiente desde el punto de vista funcional. La fibrosa externa debe ser responsable de la rigidez radial durante la sístole ventricular, mientras que la fibrosa interna debe soportar el estrés debido a la presión que se genera por el reflujo sanguíneo durante la diástole. La esponjosa, que es gruesa, debe darle plasticidad a la valva y atenuar así las vibraciones que se producen durante el cierre valvular.

El bulbo arterioso de la arawana es esencialmente elástico, aunque tiene una cantidad considerable de musculatura lisa. Las presentes observaciones no permiten llegar a conclusiones consistentes sobre la funcionalidad del bulbo en esta especie. Sin embargo y a título especulativo, cabe aventurar que toda su musculatura debe relajarse durante la sístole ventricular, permitiendo así que el bulbo se dilate para facilitar el flujo de sangre hacia la aorta ventral. En este proceso, la gruesa capa de colágeno del subepicardio debe jugar un papel importante al evitar que el bulbo se dilate en demasía. Durante la diástole ventricular, la contracción de la musculatura lisa debe estrechar y acortar el bulbo, contribuyendo así a la eyección de sangre hacia la aorta.

El rasgo más significativo del bulbo arterioso de la arawana es la presencia de dos crestas mayores, dorsal y ventral, en su cara interna que sirven de anclaje de las válvulas conales. Hasta el momento, estas estructuras no se han descrito en ninguna otra especie. La elasticidad de las crestas y, en particular, la presencia en ellas de células musculares lisas sugieren que deben tener un papel activo en la actividad de las válvulas conales. La contracción de la musculatura debe tirar de las comisuras en sentido distal, contribuyendo así al cierre del aparato valvular. La relajación de la musculatura, a su vez, debe facilitar la abertura de las válvulas.

El significado de las células pigmentadas presentes en el corazón de la arawana que se ha aducido aquí coincide con las sugerencias de Reyes Moya et al. (2015) sobre los melanóforos hallados en el corazón de *P. senegalus*. Deben ser células derivadas de la cresta neural con una presunta actividad de tipo inmunitario.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones finales principales que se enuncian a continuación corresponden al conjunto de las cuatro publicaciones que integran la presente tesis.

1. La información actual sobre la anatomía, histomorfología y embriología del tracto de salida del corazón de los condictios y actinopterigios permite afirmar que, en todos ellos, dicha región consta de dos componentes: el cono arterioso, que es miocárdico y está provisto de válvulas, y el bulbo arterioso, exento de miocardio y de válvulas, formado principalmente por musculatura lisa y elastina. Ambos componentes debieron existir desde el inicio de la radiación evolutiva de los vertebrados gnatostomados.
2. Hay datos que avalan la idea de que el cono arterioso apareció en los agnatos. En cambio, el origen evolutivo del bulbo arterioso sigue sin conocerse.
3. Hay indicios suficientemente sólidos para pensar que el cono arterioso y el bulbo arterioso derivan embrionariamente del campo cardiogénico secundario.
4. El corazón primitivo de los vertebrados gnatostomados debió estar formado por un seno venoso, con el marcapasos cardiaco, un atrio, con miocardio trabeculado, una región atrioventricular, con las válvulas atrioventriculares, un ventrículo, con miocardio mixto, un cono arterioso, con miocardio compacto y válvulas, y un bulbo arterioso, no miocárdico.
5. El corazón de los condictios ha mantenido el diseño anatómico primitivo. En los actinopterigios, el cono ha tendido a reducirse de tamaño en concomitancia con un gran desarrollo del bulbo arterioso que, en los teleósteos, tiene características moleculares únicas.
6. En muchas especies de actinopterigios, el miocardio ventricular es de tipo esponjoso debido a la pérdida de la capa de miocardio compacto durante la evolución.

7. El aparato valvular del tracto de salida cardiaco de *Raja aterías* consta de cuatro hileras transversales de tres válvulas cada una. La disposición de las válvulas de la hilera anterior se corresponde con el patrón anatómico primitivo que se ha conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados gnatostomados.

8. El tracto de salida del corazón de la arawana, *Osteoglossum bicirrhosum*, que presenta el diseño anatómico básico de los teleósteos, ofrece un claro testimonio de la reducción en tamaño que ha experimentado el cono arterioso desde principios de la radiación evolutiva de este grupo de actinopterigios. En la cara interna del bulbo hay dos crestas longitudinales prominentes, una dorsal y otra ventral, que deben jugar un papel activo en la dinámica de las válvulas conales y que, por el momento, no se han descrito en ninguna otra especie.

9. Las células pigmentadas, con melanina, halladas en el corazón de dos especies de holocéfalos y otra de teleósteos sugieren que, en el corazón de los peces, la cresta neural puebla un territorio cardiaco más amplio de lo que se había supuesto hasta la actualidad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Issa R, Waldo K, Kirby ML. 2004. Heart fields: one, two or more? *Developmental Biology* 272, 281-285.
- Abu-Issa R, Kirby ML. 2007. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 45-68.
- Amemiya Y, Irwin DM, Youseon JH. 2006. Cloning of stanniocalcin (STC) cDNAs of divergent teleost species: monomeric STC supports monophyly of the ancient teleosts, the osteoglossomorphs. *General and Comparative Endocrinology* 149, 100-107.
- Anderson RH. 2000. Clinical anatomy of the aortic root. *Heart* 84, 670-673.
- Anderson RH, Webb S, Brown N, Lamers W, Moorman A. 2003. Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart* 89, 1110-1118.
- Anthony J, Millot J, Robineau D. 1965. Le coeur et l'aorte ventrale de *Latimeria chalumnae* (Poisson, Coelocanthidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 261, 223-226.
- Benton MJ, Donoghue PC, Asher RJ. 2009. Calibrating and constraining molecular clocks. En *Timetree of Life* (Heand SB, Kumar S eds); pp. 35-86. Oxford University Press, Oxford.
- Bertin L. 1958. Appareil circulatoire. En *Traité de Zoologie* (Grassé PP, ed.), vol. 13, fasc. 2; pp. 1399-1458. Mason, Paris.
- Betancour-R R, Broughton RE, Wiley EO, Carpentier K, López JA, Li C, Holcroft NI, Arcila D, Sanciangco M, Cureton II JC, Zhang F, Buser T, Campbell MA, Ballesteros JA, Willis S, Borden WC, Rowley T, Reneau PC, Hough DJ, Lu G, Grande T, Arratia G, Orti G. 2013. The Tree of Life and a new classification of bony fishes. *PLOS Currents Tree of Life*, 1-40.
- Black, BL. 2007. Transcriptional pathways in second heart field development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18, 67-76.
- Blair JE, Hedges SB. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution* 22, 2275-2284.
- Boas JEV. 1880. Über den Conus arteriosus bei *Butirinus* und bei anderen Knochenfischen. *Morphologisches Jahrbuch* 6, 527-534.

- Boas JEV. 1901. *Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Borucinska JD, Obasa OA, Haffey NM, Scott JP, Williams LN, Baker SM, Min S, Kaplan JA, Mudimala R. 2012. Morphological features of coronary arteries and lesions in hearts from five species of sharks collected from the northwestern Atlantic Ocean. *Journal of Fish Diseases* 35, 741-753.
- Brade T, Gessert S, Kühl M, Pandur P. 2007. The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Developmental Biology* 311, 297-310.
- Bidge TW. 1904. Fishes (exclusive of the systematic account of Teleostei). En *The Cambridge Natural History* (Harmer SF, Shipley AE eds), vol. 7; pp. 141-537. McMillan, London.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6, 826-35.
- Cox GK, Kennedy GE, Farrell AP. 2016. Morphological arrangement of the coronary vasculature in a shark (*Squalus sucklei*) and a teleost (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Morphology* 277, 896-905.
- Cuvier G. 1805. *Leçons d'Anatomie Comparée*. Vol. 4, p. 228. Boudouin, Paris.
- Daniel JF. 1934. *The Elasmobranch Fishes*. University of California, Berkeley, California.
- Davie PS, Farrell AP. 1991. The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69, 1993-2001
- De Andrés AV, Muñoz-Chápuli R, Sans-Coma V, García-Garrido L. 1990. Anatomical studies of the coronary system in Elasmobranchs: I. Coronary arteries in lamnoid sharks. *American Journal of Anatomy* 187, 303-310.
- De Andrés AV, Muñoz-Chápuli R, Sans-Coma V, García-Garrido L. 1992. Anatomical studies of the coronary system in Elasmobranchs: II. Coronary arteries in hexanchoid, squaloid and carcharhinoid sharks. *Anatomical Record* 233, 429-439.
- De Andrés AV, Muñoz-Chápuli R, Sans-Coma V. 1993. Development of the coronary arteries and cardiac veins in the Dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *The Anatomical Record* 235, 436-442.
- Didier DD. 2004. Phylogeny and classification of extant holocephali. En *Biology of Sharks and Their Relatives* (Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR. eds), pp. 115-135. CRC Press, Boca Raton.

- Diogo R, Kelly RG, Christiaen L, Levine M, Ziemermann JM, Molnar J L, Noden D M, Tzahor E. 2015. A new heart for a new head in vertebrate cardiopharyngeal evolution. *Nature* 520, 466-473.
- 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. *Journal of Anatomy* 213, 597-606.
- Durán AC, Rodríguez C, Gil de Sola L, Fernández B, Arqué JM, Sans-Coma V. 2010. Intimal thickening of coronary arteries in the rabbitfish *Chimaera monstrosa* L. (Chondrichthyes; Holocephali). *Journal of Fish Diseases* 33, 675-682.
- Durán AC, Reyes-Moya I, Fernández B, Rodríguez C, Sans-Coma, V Grimes A. 2014. The anatomical components of the cardiac outflow tract of the gray bichir *Polypterus senegalus*: their evolutionary significance. *Zoology* 117, 370-376.
- 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, 501-510.
- Faircloth BC, Sorenson L, Santini F, Alfaro ME. 2013. A phylogenomic perspective on the radiation of ray-finned fishes based upon targeted sequencing of ultraconserved elements (UCEs). *PLoS One* 8, e65923.
- Farrell AP. 2007. Cardiovascular system in primitive fishes. En *Primitive Fishes* (McKenzie DJ, Farrell AP, Brunner CJ eds); pp. 53-120. Elsevier, Amsterdam.
- Farrell AP, Jones DR. 1992. The heart. En *Fish Physiology* (Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP, eds), vol. 12, part A; pp. 1-87. Academic Press, San Diego.
- 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 *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* (Sedmera D, Wang T, eds), pp. 74-102. Springer, New York.
- Gallego A, Durán AC, De Andrés AV, Navarro P, Muñoz-Chápuli R. 1997. Anatomy and development of the sinoatrial valves in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Anatomical Record* 248, 224-232.
- García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R, De Andrés V. 1993. Coronary arteriosclerosis in dogfish (*Scyliorhinus canicula*). An assessment of some potential risk factors. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13, 876-885.

- Garofalo F, Imbrogno S, Tota B, Amelio D. 2012. Morpho-functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A; Molecular and Integrative Physiology* 163, 215-222.
- Gegenbaur C. 1866. Zur vergleichenden Anatomie des Herzens. *Jenaische Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaft* 2, 365-386.
- Gegenbaur C. 1891. Über den Conus arteriosus der Fische. *Morphologisches Jahrbuch* 17, 596-610.
- Gegenbaur C. 1901. *Vergleichende Anatomie der Wirbelthiere mit Berücksichtigung der Wibellosen*, vol.2. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Goodrich ES 1930. *Studies on the Structure and Development of Vertebrates*. Macmillan, London.
- Greer-Walker M, Santer M, Benjamin M, Norman D. 1985. Heart structure of some deepsea fish (Teleostei: Macrouridae). *Journal of Zoology, London* 205, 75-89.
- Grimes AC. 2015. The cardiac outflow tract of primitive fishes. En *Phylogeny, Anatomy and Physiology of Ancient Fishes* (Zaccone G, Dabrowski K, Hedrick MS, Fernandes JMO, Icardo JM eds), pp. 151-178. CRC Press, Boca Raton.
- Grimes AC, Stadt HA, Shepherd IT, Kirby ML. 2006. Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart. *Developmental Biology* 290, 265-276.
- Grimes AC, Kirby ML. 2009. The cardiac outflow tract of fishes: anatomy, genes and evolution. *Journal of Fish Biology* 74, 983-1036.
- Grimes AC, Durán AC, Sans-Coma V, Hami D, Santoro M, Torres M. 2010. Phylogeny informs ontogeny: a proposed common theme in the arterial pole of the vertebrate heart. *Evolution and Development* 12, 552-567.
- Grodzinski Z. 1938. Das Blutgefäßsystem der Fische. En *Klassen und Ordnungen des Tierreichs* (Bronn HG ed.), vol. 6; pp. 1-77. C. F. Winter, Leipzig.
- Grogan ED, Lund R. 2004. The origin and relationships of early chondrichthyes. En *Biology of Sharks and Their Relatives* (Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR eds), pp. 3-31. CRC Press, Boca Raton.
- Guerrero A, Icardo JM, Durán AC, Gallego A, Domezain A, Colvee E, Sans-Coma V. 2004. Differentiation of the cardiac outflow tract components in alevins of the sturgeon *Acipenser naccarii* (Osteichthyes, Acipenseriformes): Implications for heart evolution. *Journal of Morphology* 260, 172-183.

- Guerrero A, Durán AC, Icardo JM, Fernández B, Domezain A, Sans-Coma V. 2007. Dorsoventral transposition of the heart chambers in sturgeon *Acipenser naccarii* alevins. *Diseases of Aquatic Organisms* 78, 173-177.
- Hami D, Grimes AC, Kirby ML. 2011. Zebrafish cardiac development requires a conserved secondary heart field. *Development* 138, 2389-2398.
- Heimberg AM, Cowper-Sal-Lari R, Sémon M, Donoghue PCJ, Peterson KJ. 2010. microRNAs reveal the interrelationships of the hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 19379-19383.
- Hokken RB, Bartelings MM, Bogers AJJC, Gittenberger-de Groot AC. 1997. Morphology of the aortic and pulmonary roots with regard to the pulmonary autograft procedure. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 113, 453-461.
- Home E. 1809. An anatomical account of the *Squalus maximus* (of Linnaeus), which in the structure of its stomach forms an intermediate link in the gradation of animals between the whale tribe and cartilaginous fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 99, 206-220.
- Home E. 1813. Additions to an account of the anatomy of the *Squalus maximus*, contained in a former paper, with observations on the structure of the branchial artery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 103, 227-241.
- Hoyer H. 1900. Zur Morphologie des Fischherzens. *Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Krakau* 7, 263-279.
- Hu N, Sedmera D, Yost H. 2000. Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record* 260, 148-157.
- Icardo JM. 2006. Conus arteriosus of teleost heart: dismissed, but not missed. *The Anatomical Record* 288A, 900-908.
- Icardo JM. 2012. The teleost heart: a morphological approach. En *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* (Sedmera D, Wang T, eds), pp. 35-53. Springer, New York.
- Icardo JM. 2017. Heart morphology and anatomy. En *The Cardiovascular System. Morphology, Control and Function* (Gamperl K, Gillis TE, Farrell AP, Brauner CJ eds) Fish Physiology, 36, part A, 1-54. Elsevier, Science Direct.

- Icardo JM, Colvee E, Cerra MC, Tota B. 2002a. Structure of the conus arteriosus of the sturgeon (*Acipenser naccarii*) heart. I: the conus valves and the subendocardium. *The Anatomical Record* 267, 17-27.
- Icardo JM, Colvee E, Cerra MC, Tota B. 2002b. Structure of the conus arteriosus of the sturgeon (*Acipenser naccarii*) heart. II: the myocardium, the subepicardium, and the conus-aorta transition. *The Anatomical Record* 268, 388–398.
- Icardo JM, Schib JL, Ojeda JL, Durán AC, Guerrero A, Colvee E, Amelio D, Sans-Coma V. 2003. The conus valves of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Journal of Anatomy* 202, 537-550.
- Icardo JM, Guerrero A, Durán AC, Domezaín A, Colvee E, Sans-Coma V. 2004. The development of the sturgeon heart. *Anatomy and Embryology* 208, 439-449.
- Icardo JM, Guerrero A, Durán AC, Colvee E, Domezain A, Sans-Coma V. 2009a. The developmental of the epicardium in the sturgeon *Acipenser naccarii*. *The Anatomical Record* 292, 1593-1601.
- Icardo JM, Guerrero A, Durán AC, Colvee E, Domezain A, Sans-Coma V. 2009b. The developmental anatomy of the heart of the sturgeon *Acipenser naccarii*. En: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*. Carmona R, Domezain A, García-Gallego M, Hernando JA, Rodríguez F, Ruiz-Rejón M eds). Fish & Fisheries Series 29, 137-153. Springer Verlag, Alemania.
- Icardo JM, Colvee E, Schorno S, Lauriano ER, Fudge DS, Glover CN, Zaccone G. 2016. Morphological analysis of the hagfish heart. I. The ventricle, the arterial connection and the ventral aorta. *Journal of Morphology* 277, 326-340.
- Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, Nishid M. 2003. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic pererspective on the phylogeny of the “ancient fish.” *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 110-120.
- Inoue JG, Miya M, Lam K, Boon-Hut T, Danks JJ, Bell J. 2010. Evolutionary origin and phylogeny of the modern holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): a mitogenomic perspective. *Molecular Biology and Evolution* 27, 2576-2586.
- Jensen B, Boukens BJD, Wang T, Moorman AFM, Christoffels VM. 2004. Evolution of the sinus venosus from fish to human. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 1, 14-28.
- Johansen K, Burggren W. 1980. Cardiovascular function in the lower vertebrates. En: *Heart and Heart-like Organs* (Bourne G ed.), vol 1; pp. 61-117. Academic Press, New York.

- Kardong KV. 2002, *Vertebrates. Comparative Anatomy, Function, Evolution*. McGraw-Hill, New York.
- Keith A. 1924. The fate of the bulbus cordis in the human heart. *Lancet* 2, 1267-73.
- Kelly RG. 2005 Molecular inroads into the anterior heart field. *Trends in Cardiovascular Medicine* 15, 51-56.
- Kelly RG. 2012. The second heart field. *Current Topics in Developmental Biology* 100, 33-65.
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Developmental Cell* 1, 435-440.
- Kelly RG, Buckingham ME. 2002. The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends in Genetics* 18, 210-216.
- Kisch, B. 1930. Die Zentralwülste im Conus arteriosus der Selachier. *Anatomischer Anzeiger*, 70, 462-470.
- Kokubo N, Matsuura M, Koh O, Tiecke E, Kuraku S, Kuratani S, Tanaka M. 2010. Mechanisms of heart development in the Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Evolution & Development* 12, 34-44.
- Krause R. 1923. *Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere. IV. Teleostier, Plagiostomen, Zyklostomen und Leptokardier*. Walter de Gruyter, Berlin
- Lawson R. 1979. The comparative anatomy of the circulatory system. En *Hyman's Comparative Vertebrate Anatomy*, 3ª edición (Wake MH ed.), pp. 448-554. University of Chicago Press, Chicago.
- Lee YH, Saint-Jeannet JP. 2011. Cardiac neural crest is dispensable for outflow tract septation in *Xenopus*. *Development* 138, 2025-2034.
- Licht JH, Harris WS. 1973. The structure, composition and elastic properties of the teleost bulbus arteriosus in the carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 46, 699-708.
- 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 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. *Biological Reviews* doi: 10.1111/brv.12411.

- 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. *Anatomia Histologia Embryologia*. doi: 10.1111/ahe.12409.
- Lund R, Grogan ED. 1997. Relationships of the Chimaeriformes and the basal radiation of the Chondrichthyes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 65-123.
- Maldanis L, Carvalho M, Ramos Almeida M, Freitas FI, Ferreira Gomes de Andrade JA, Silva Nunes S, Rochitte CE, Poppi RJ, Oliveira Freitas R, Rodrigues F, Siljeström S, Alves Lima F, Galante D, Carvalho IS, Perea CA, Rodrigues de Carvalho R, Bettini J, Fernandez V, Xavier-Neto J. 2016. Heart fossilization is possible and informs the evolution of cardiac outflow tract in vertebrates. *eLife* 5. doi: 10.7554/eLife.14698.
- March HW, Ross JK, Lower RR. 1962. Observations on the behaviour of the right ventricular outflow tract, with reference to its developmental origins. *American Journal of Medicine* 32, 835-45.
- Meckel JF. 1831. *System der vergleichenden Anatomie; Fünfter Theil*. Rengerschen Buchhandlung, Halle.
- Meyer A, Zardoya R. 2003. Recent advances in the (molecular) phylogeny of vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 34, 311-338.
- Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern M, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. 2001. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart forming field. *Developmental Biology* 238, 97-109.
- Moorman AFM, Christoffels VM. 2003. Development of the cardiac conduction system: a matter of chamber development. *Novartis Foundation Symposia* 250, 25-34.
- Moorman AFM, Christoffels VM, Anderson RH, Van den Hoff MJB. 2007. The heart forming fields: one or multiple? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 362, 1257-1265.
- 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 Communications* 19; 7:10397, doi: 10.1038/ncomms10397.
- Müller J. 1842. Bemerkungen über eigenthümliche Herzen der Arterien-und Venensystem. En *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin* (Müller J, ed.), pp. 483-484. Von Veit & Comp., Berlin.

- Müller J. 1845. Ueber den Bau und die Grenzen der Ganoiden, und über das natürliche System der Fische. *Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 11, 91-141.
- Muñoz-Chápuli R, García-Garrido L, de Andrés V. 1991. Coronary myointimal lesions in the dogfish shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Comparative Pathology* 105, 387-395.
- Muñoz-Chápuli R, De Andrés V, Dingerkus G. 1994a. Coronary artery anatomy and elasmobranch phylogeny. *Acta Zoologica Stockholm* 75, 249-254.
- Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, De Andrés V, Gallego A, Navarro P. 1994b. Cardiac development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): a model for the study of vertebrate cardiogenesis. *Cardioscience* 5, 245-253.
- Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, Fernández B, Sans-Coma V. 1997. Development of the epicardium in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Acta Zoologica Stockholm* 78, 39-46.
- Nadal J. 2001. *Vertebrados. Origen, organización, diversidad y biología*. Edicions de la Universitat de Barcelona y Ediciones Omega, Barcelona.
- O'Donoghue CH, Abbott E. 1928. The blood vascular system of the spiny dogfish, *Squalus acanthias* Linne and *Squalus sucklii* Gill. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 55t, 125-190.
- Parker TJ, Haswell WA. 1962. *A textbook of Zoology*, 7ª edición revisada por Marshall AJ. Macmillan, London.
- Parsons CW. 1930. The conus arteriosus of fishes. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 73, 145-176.
- Pettigrew JB. 1864. On the relations, structure and function of the valves of the vascular system in vertebrates. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 23, pt. III, 761-805.
- Priede IG. 1976. Functional morphology of the bulbus arteriosus of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Journal of Fish Biology* 9, 209-216.
- Poelmann RE, Gittenberger-de-Groot AC, Biermans MWM, Dolfing AI, Jagessar A, van Hattum S, Hoogenboom A, Wisse LJ, Vicente-Steijn R, De Bakker MAG, Vonk FJ, Hirasawa T, Kuratani S, Richardson MK. 2017. Outflow tract septation and the aortic arch systems in reptiles: lessons for understanding the mammalian heart. *Evolutionary and Developmental Biology*, May 10;8:9. doi: 10.1186/s13227-017-0072-z.

- Randall D, Davie PS. 1980. The hearts of urochordates and cephalocordates. En *Heart and Heart-like Organs* (Bourne G ed.), vol 1; pp. 41-60. Academic Press, New York.
- Reyes-Moya I, Torres-Prioris A, Sans-Coma V, Fernández B, Durán AC. 2015. Heart pigmentation in the gray bichir, *Polypterus senegalus* (Actinopterygii: Polypteriformes). *Anatomia Histologia Embryologia* 44, 475-480.
- 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. *Zoologischer Anzeiger* 252, 359-366.
- Rodríguez C, Fernández B, Olivero J, Salmerón F, Torres-Prioris A, Sans-Coma V, Durán AC. 2016. The relative length of the cardiac bulbus arteriosus reflects phylogenetic relationships among elasmobranchs. *Zoologischer Anzeiger* 263, 84-91.
- 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.
- Sans-Coma V, Gallego A, Muñoz-Chápuli R, De Andrés AV, Durán AC, Fernández B. 1995. Anatomy and histology of the cardiac conal valves of the adult dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *The Anatomical Record* 241, 496-504.
- Sans-Coma V, Rodríguez C, López-Unzu MA, Lorenzale M, Fernández B, Vida L, Durán AC. 2017. Dicephalous versus diprosopus sharks: first record of a two-headed embryo of Atlantic sawtail catshark and review of the literature. *Journal of Fish Biology* 90, 283-293.
- Santer RM. 1985. Morphology and innervation of the fish heart. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* 89, 1-102.
- Santer RM, Greer Walker M. 1980. Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. *Journal of Zoology, London* 190, 259-272.
- Satchell GH. 1991. *Physiology and Form of Fish Circulation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Satchell GH, Jones MP. 1967. The function of the conus arteriosus in the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal of Experimental Biology* 46, 373-382.
- Schib JL, Icardo JM, Durán AC, Guerrero A, López D, Colvee E, de Andrés AV, Sans-Coma V. 2002. The conus arteriosus of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Journal of Anatomy* 201, 395-404.
- Senior HD. 1907a. The conus arteriosus in *Tarpon atlanticus* (Cuvier & Valenciennes). *Biological Bulletin* 12, 146-151.

- Senior HD. 1907b. Note on the conus of *Megalops cyprinoides* (Broussonet). *Biological Bulletin* 12, 378-379.
- Senior HD. 1907c. Teleosts with a conus having more than one row of valves. *The Anatomical Record* 4, 83-84.
- Senior HD. 1909. The development of the heart of the shad (*Alosa sapidissima* Wilson). *The American Journal of Anatomy* 9, 211-262.
- Simoës-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CY, Davidson B, Xavier-Neto J. 2005. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Developmental Biology* 277, 1-15.
- Smith WC. 1918. On the process of disappearance of the conus arteriosus in teleosts. *The Anatomical Record* 15, 65-71.
- Stannius HF. 1846. *Bemerkungen über das Verhältniss der Ganoiden zu den Clupeiden insbesondere zu Butirinus*. Oeberg, Rostock.
- Stannius HF. 1854. *Handbuch der Anatomie der Wirbelthiere*. Von Veit & Comp., Berlin.
- Stöhr P. 1876. Ueber den Klappenapparat im Conus arteriosus der Selachier und Ganoiden. *Morphologisches Jahrbuch*. 2, 197-228.
- Stolfi A, Gainous TB, Young JJ, Mori A, Levine M, Christiaen L. 2010. Early chordate origins of the vertebrate second heart field. *Science* 329, 565-568.
- Sudak FN. 1965. Intrapericardial and intracardiac pressures and the events of the cardiac cycle in *Mustelus cants* (Mitchill). *Comparative Biochemistry and Physiology* 14, 689-705.
- Takezaji N, Figueroa F, Zakeska-Rutczynska Z, Klein J. 2003. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Molecular Biology and Evolution* 20, 287-292.
- Tiedemann F. 1809. *Anatomie des Fischherzens*. Thomann, Landshut.
- Tota B. 1989. Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. *Journal of Experimental Zoology Suppl* 2, 122-135.
- Tota B, Cimini V, Salvatore G, Zumo G. 1983. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. *The American Journal of Anatomy* 167, 15-32.
- Waldo KL, Kuminski DH, Wallis KT, Stadt, HA, Hutson MR, Platt, HD, Kirby ML. 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128, 3179-3186.

- Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, Kuminski DH, Abu-Issa R, Kirby ML. 2005. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Developmental Biology* 28, 78-90.
- Weichert CK, Presch W. 1975. *Elements of Chordate Anatomy*. McGraw-Hill, New York.
- White E. 1936. The heart valves of the elasmobranch fishes. *American Museum Novitates* 838, 1-21.
- Wright GM. 1984. Structure of the conus arteriosus and ventral aorta in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*: microfibrils, a major component. *Canadian Journal of Zoology* 62, 2445-2456.
- Yamauchi A. 1980. Fine structure of the fish heart. En *Heart and Heart-like Organs* (Bourne G ed.), vol 1; pp. 119-148. Academic Press, New York.
- Yu X, Zhu M, Zhao W. 2010. The origin and diversification of the osteichthyans and sarcopterygians: rare Chinese fossil findings. Advance Research on key issues of evolution. *Paleoichthyology* 24, 71-75.
- Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. 2004. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circulation Research* 95, 261-268.
- Zhou Y, Cashman T, Nevis KR, Obregon P, Carney SA, Liu Y, Gu A, Mosimann C, Dondalle S, Peterson, RE, Heidemann W, Burns CE Burns CG. 2011. Latent FGF-binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish. *Nature* 474, 645-648.

VII. PUBLICACIONES ORIGINALES Y COMENTARIO DE LOS REVISORES

The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians

Miguel Lorenzale¹, Miguel A. López-Unzu^{1,2}, Cristina Rodríguez^{1,2},
Borja Fernández^{1,2*}, Ana C. Durán^{1,2} and Valentín Sans-Coma¹

¹*Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain*

²*Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain*

ABSTRACT

The outflow tract of the fish heart is the segment interposed between the ventricle and the ventral aorta. It holds the valves that prevent blood backflow from the gill vasculature to the ventricle. The anatomical composition, histological structure and evolutionary changes in the fish cardiac outflow tract have been under discussion for nearly two centuries and are still subject to debate. This paper offers a brief historical review of the main conceptions about the cardiac outflow tract components of chondrichthyans (cartilaginous fish) and actinopterygians (ray-finned fish) which have been put forward since the beginning of the nineteenth century up to the current day. We focus on the evolutionary origin of the outflow tract components and the changes to which they have been subject in the major extant groups of chondrichthyans and actinopterygians. In addition, an attempt is made to infer the primitive anatomical design of the heart of the gnathostomes (jawed vertebrates). Finally, several areas of further investigation are suggested. Recent work on fish heart morphology has shown that the cardiac outflow tract of chondrichthyans does not consist exclusively of the myocardial conus arteriosus as classically thought. A conus arteriosus and a bulbus arteriosus, devoid of myocardium and mainly composed of elastin and smooth muscle, are usually present in cartilaginous and ray-finned fish. This is consistent with the suggestion that both components coexisted from the onset of the gnathostome radiation. There is evidence that the conus arteriosus appeared in the agnathans. By contrast, the evolutionary origin of the bulbus is still unclear. It is almost certain that in all fish, both the conus and bulbus develop from the embryonic second heart field. We suggest herein that the primitive anatomical heart of the jawed vertebrates consisted of a sinus venosus containing the pacemaker tissue, an atrium possessing trabeculated myocardium, an atrioventricular region with compact myocardium which supported the atrioventricular valves, a ventricle composed of mixed myocardium, and an outflow tract consisting of a conus arteriosus, with compact myocardium in its wall and valves at its luminal side, and a non-myocardial bulbus arteriosus that connected the conus with the ventral aorta. Chondrichthyans have retained this basic anatomical design of the heart. In actinopterygians, the heart has been subject to notable changes during evolution. Among them, the following two should be highlighted: (i) a decrease in size of the conus in combination with a remarkable development of the bulbus, especially in teleosts; and (ii) loss of the myocardial compact layer of the ventricle in many teleost species.

Key words: heart, cardiac outflow tract, conus arteriosus, bulbus arteriosus, anatomy, evolution, fish, gnathostomes, chondrichthyans, actinopterygians.

CONTENTS

I. Introduction	2
II. Historical view	3
III. Current understanding	4
(1) The bulbus arteriosus of phylogenetically early actinopterygians	4

* Author for correspondence (Tel: +34 952 137371; E-mail: borjafe@uma.es).

Comentarios de los revisores en la publicación 1

The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians

Los componentes anatómicos del tracto de salida cardíaco de condriictios y actinopterygios

Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Cristina Rodríguez, Borja Fernández, Ana C. Durán, Valentín Sans-Coma

Biological Reviews (2018) Aug;93(3):1604-1619 doi: 10.1111/brv.12411

Primera respuesta del editor

We have now received two sets of comments from referees. There is some similarity in their major messages, and both are (a) positive enough to request you do further work on the manuscript, and (b) detailed and constructive in their critique. As you will see, adding the two sets of comments together provides a very extensive list of comments. However, there are a few major comments. (1) the current text is somewhat overlong and repetitive, (2) there are perhaps not enough figures (referee 1 even provides one), (3) a phylogeny would be useful to guide readers and the development of the argument, (4) the manuscript is currently unbalanced with insufficient information on the conus, for which, referee 1 is sure, a review is needed. Given that both referees are in principal happy with the topic and the potential of the manuscript, please undertake a major revision to incorporate the major and minor comments from the referees. Given the major changes, we'll need to seek referee support again, but I would anticipate an eventual positive outcome if your changes are done well. When you resubmit, please incorporate a detailed description of how you have dealt with the comments.

Primera respuesta del revisor 1

General comments

The manuscript of Lorenzale et al concerns the evolution of the principal components to the cardiac outflow tract. Recent studies by Moriyama et al (2016) and Icardo et al (2016) add new insights and the submitted review is not only interesting and timely, but also carried out by one of the foremost groups in this field. The text is erudite and well-written, although at times verbose, and opposing views on key topics are included. Below I have several general and specific comments. I encourage the authors to focus on two key points

of contention and in need of reviewing, and subsequently trim the text to serve these two points: 1) what is evolutionary origin of the bulbus arteriosus, the intra-pericardial non-myocardial outflow tract, and 2) what is evolutionary origin of the conus arteriosus, the myocardial outflow tract.

The manuscript attempts to make a distinction between descent with modification and novelty. Please look up “deep homology” as discussed by, for instance, by Shubin et al 2009 Nature, Wake et al 2011 Science, and Hall 2012 *Evo & Dev*. The authors are the main proponents of the view that the chondrichthyans have a bulbus arteriosus and thus that the bulbus arteriosus is evolutionarily old. This view was recently opposed by Moriyama et al 2016. The chondrichthyan bulbus arteriosus is intrapericardial and has elastin and smooth muscle in greater amounts than the extra-pericardial ventral aorta, so the bulbus arteriosus and ventral aorta are different (Duran et al 2008). However, the authors do not accept the view of Moriyama et al 2016 that the bulbus arteriosus of teleost fish is different from the chondrichthyan bulbus arteriosus by having much greater amounts of elastin, and a novel elastin, and smooth muscle. Oppositely, the authors do not seem to discuss and endorse the view of Grimes & Kirby 2009 that the intrapericardial and non-myocardial outflow of hagfish and lampreys should be considered the bulbus arteriosus – why not? So, I miss a more stringent application of consistent criteria: if the chondrichthyan bulbus is different from the ventral aorta by different amounts of similar principal components, then why is the teleost bulbus not different from the non-teleost bulbus since it not only has different amounts of similar principal components, it also has great amounts of a new component – elastin²? The application of criteria also applies to the second key point of contention, namely the origin of the conus arteriosus. The authors rightly discuss the literature on the heart of hagfishes and lampreys so to clarify the evolutionary origins of the conus and bulbus arteriosus. However, this literature is also controversial. Specifically, the authors rightly cite Icardo et al 2016 on the outflow of the hagfish heart where it is shown that the single arterial valve is partly anchored in myocardium, as also shown in Grimes and Kirby 2009. The view is that this myocardium should not be equated to conal myocardium. Why not? Is it not a simple definition of the conus arteriosus that it is the myocardium which i) is downstream of the atrioventricular canal and ii) anchors valve leaflets? If so, the conus arteriosus is present, albeit in a poorly developed state, in hagfishes. It seems to me, this scenario is the simplest, please see the attached figure. Instead, if we maintain the view of Grimes & Kirby 2009 and Icardo et al 2016 and the one of the present manuscript, then the hagfish is without a conus and we are left with a complicated evolutionary scenario where

some valve-anchoring myocardium is present in hagfish, but this has been lost in chondrichthyans and chondrichthyans have evolved anew a conus. In other words, if the authors want to maintain that the hagfish do not have a conus, what do the hagfish have then? Also, I would like to have the authors consider the study by Pombal et al 2008 *Evol & Dev* where lampreys are shown to have a conus arteriosus and epicardium. Is the origin of the conus arteriosus not within the agnathans? The title accurately describes what has been studied in the reviewed literature, but the topic is actually “Evolution of the outflow tract of the heart (of fishes)” would this be a more appropriate title? I miss a bit more physiology of the outflow tract. Also, what are we to make of that the formed hearts of hagfish (primitive condition) and amniotes (a derived condition) are without a conus or bulbus as seen in chondrichthyans and teleosts respectively?

The manuscript should have a phylogenetic tree in a figure that lists at a minimum the taxonomic groups that are commonly referred to in the manuscript. Besides groups within chondrichthyans and actinopterygii, it should also include hagfish, lampreys, and tetrapods. You could take inspiration from Figure 2 of Grimes & Kirby 2009.

Your use of regression and reduction of the conus arteriosus has two different meanings, one is proportional regression/reduction (an outcome of positive allometry), and the other is actual regression/reduction, i.e. loss of absolute length and mass (as happens in amniotes, also see comments below). Make sure it is always clear whether it is proportional or actual regression you are discussing.

Section I (Introduction)

This section makes clear that evolution of the outflow tract is a controversial topic, but it does not make clear what the key points of contention are. Please amend. It seems to me the interest of the authors is the evolutionary origin of the bulbus arteriosus, in particular whether it can be said to have an old origin (position of the authors), or whether it evolved concomitant with the third whole genome duplication in teleost fish.

Section II (history)

I think this section can be reduced to about half its current length. From the perspective of insights, the distinction between 19th and 20th century is not clear, in particular given that Gegenbaur straddles both centuries. The distinction between the findings of Cuvier and Tiedemann is not clear. The role of Home is not clear, and his purported relation between depth of habitat and muscularity of the outflow tract has not been validated, correct?

Gegenbaur's view (1866) was essentially that of Muller only that he deemed the conus arteriosus to be ventricular – if so, this part can be shortened. You write Line 195-198 “the concept was established ...the OFT of teleosts is composed of a reduced conus arteriosus” but you go on to state that Boas (1880) had addressed the issue of conal reduction while Gegenbaur (1866) predates Boas (1880). Line 220-221, “the conus arteriosus was considered a cardiac segment exclusive of chondrichthyans and ganoids” but this disagrees with Line 195-198. Line 275, what is meant by “incorporation into the ventricle”? Is this an explanation or an observation? In amniotes, the embryonic conus arteriosus actually gets incorporated to the ventricle, e.g. Rana et al 2007 *Circ Res*, Jensen et al 2013 *PLoS ONE*. Line 298, please specify why is this interesting. The sentences of Line 301-302 and Line 302-305 are phrased as in opposition, but they are not. Also, the criterion of Grodzinski (1938) may not be relevant: some structures of the heart have myocardium but are not chambers, i.e. atrioventricular canal, some cardiac structures, e.g. the pulmonary veins, are cardiac but may not have myocardium. Line 306-338, I find this discussion on whether the outflow tract should be considered cardiac or not to be too much about semantics.

Section III (state of the art)

Line 385-389: please refer back to which historical concepts are consistent with this view. More could be done to argue that the chondrichthyan bulbus arteriosus is in fact different from the ventral aorta.

Line 410-423: basically, the presence of the bulbus arteriosus is contingent on the regression of the conus arteriosus, making the bulbus negatively defined. Try to make it positively defined by elaborating on what sets the bulbus arteriosus apart from the ventral aorta. Please condense sub-section (5) to at least half the current length, in particular in view of the purported finding of the second heart field in the tunicate *Ciona*: most likely, the second heart field also contributes to cardiogenesis in chondrichthyans. This is also supported by the addition of *Isl1* to the forming heart of the lamprey (Kokubo et al 2010 *Evo & Dev*).

Section IV

This section reaches a sensible conclusion but would fare better if it discussed the principal reasons for making a distinction between the bulbus arteriosus and ventral aorta. Again, please consider the importance of the outflow tract covered by epicardium in lampreys and – possibly – hagfish.

Section V

This section needs to make clearer why discussions on the sinus venosus, atrium, and atrioventricular junction, is pertinent to the manuscript. The authors rightly discuss the literature on the heart of hagfishes and lampreys so to clarify the evolutionary origins of the conus and bulbus arteriosus, but please explore the arguments for that the arterial valve bearing myocardium of hagfish could be considered the precursor structure of the conus arteriosus.

Section VII

Is quite verbose and could be reduced to half its current length. The paragraph of Lines 846-857 could be summarized as the tunicates appear to have a second heart field, so most likely chondrichthyans have as well. I propose to condense this paragraph to 1-2 sentences and incorporate that in Section 3(5) dealing with the second heart field. Line 837-841: you suggest that the conus arteriosus of fish and of mammals and birds may not be homologous, but this certainly goes against the majority view and must be backed up by arguments and references.

Specific comments

Please be consistent in using: forms or formes for phylogenetic names.

Line 24 and 99: what is meant by “govern” – the magnitude of blood flow, cardiac output, is the product of stroke volume, which is largely dictated by venous pressure, and heart rate. The influence of outflow tract is limited in this regard.

Line 95-96: you have an unusual selection of components to the heart: if the atrioventricular region is included, should not the sinuatrial junction be included as well? See for instance Keith and Flack 1907 and Jensen et al 2017 Sci Reports. Also pertinent to Section V,

Line 739. Note also that Kokubo et al 2010 *Evo & Dev* not only find that, as you correctly cite, that *Tbx2/3* is expressed in the outflow of the lamprey suggesting it has a conus arteriosus, but also that *Tbx2/3* is expressed in the atrioventricular and sinuatrial junctions.

Line 143: what do you mean by “approach”? Do you not mean “view”

Line 224: attention again

Line 226: should anterior be cranial?

Line 227-230: has this notion been corroborated?

Line 239: what is the significance of the onset of conal systole before ventricular relaxation?

Line 250-257: this paragraph does not read well and could be deleted

Line 355: the two segments are different how?

Line 364: what is meant by cardiac origin besides it is a structure within the pericardium?

Line 397: supposition or hypothesis?

Line 403: the bulbus arteriosus is considered different from the ventral aorta because it is covered by epicardium. However, is the hagfish outflow tract, which the authors do not consider a bulbus arteriosus, not also covered in epicardium?

Line 417: distinct how?

Line 418: what is meant by anticipated?

Line 425: an should be and

Line 439: marked, not markedly

Line 462: besides histology, is it not also your point from Figure 3B that simple blunt dissection and inspection – e.g. by pulling the ventricle from the bulbus arteriosus – can expose the conal segment?

Line 495-490: provide the arguments of Moriyama et al 2016.

Line 507-510: it is difficult to use the derivation from the second heart field as an argument, because, as shown by Buckingham and colleagues in multiple studies, the heart muscle has clonal relations to musculature of the neck and face – yet this musculature should not be considered heart.

Line 531: move “rather” to after species

Line 593-596: this phrasing suggests that the referred studies uncovered molecular pathways, whereas in fact they are anatomical studies, correct? If so, please amend.

Line 676-7: see the recent study by Cox et al 2016 J Morph.

Line 680: “During years” – there appear to be words missing

Line 706-708: irrelevant, I suggest deletion of this sentence

Line 714: cardiac or ventricular?

Line 719-721: please clarify that there is 1 valve with 2 leaflets.

Line 722-723: what is meant by “structure of which remains uncertain”? Either rephrase or specify. Line 868: “formation ... remains uncertain”. There is no uncertainty whether the valves form or not – they do – so what is meant. Either rephrase or specify.

Line 727: by myocardium.

Line 729-730: please insert reference or references at the end of the sentence.

Line 755: absence of an.

Line 779-782: the meaning of this sentence is not clear, “scale denoting” etc.

Line 870-873: the formative forces may indeed be illusive, but there is a substantial literature on flow perturbation in zebrafish development and it may also address valve maturation.

Line 876: that still has not been illucidated.

Line 885: state explicitly the purported relation between conus arteriosus and type of ventricular myocardium.

Primera respuesta del revisor 2

General comments

Manuscript ID BRV-08-2017-0176 entitled "The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians"

This is a thorough review of the historical and modern literature on the OFT in fishes with a focus on the early Gnathostomata and the transition from jawless to jawed fishes. This is a comprehensive review that makes a good attempt at collecting and discussing conflicting data sets. However, I think that before publication there are a number of points that need to be addressed. My main concerns are the low number of figures used, particularly the lack of a phylogeny upon which various morphological traits are mapped. The flow is sometimes confusing and repetitive. I have made a list of suggestions below which all should be easily achievable by the authors.

Firstly, the review is overly long. It drags and is repetitive, which is particularly evident in the earlier sections. This makes the review confusing and hard to follow. Secondly, the introduction as it stands is poor. After reading it I was not sure what the main focus of the review was, what question they were reviewing or what the importance of it is. This should be rewritten with greater clarity and focus. Thirdly, the language used in the review is often awkward. I would recommend proof reading and editing by a native English speaker. I would start off by suggesting you include a basic vertebrate phylogeny at the start so the uninitiated can understand the where the chondrichthyans and actinopterygians are and how they related to jawed v jawless fishes. Later, I will suggest you insert another phylogenetic tree (possibly separate ones for chondrichthyans and actinopterygians) upon which you map the main findings you draw from this review. I understand that it is not completely straight forward but I think the attempt needs to be made

Line 2 perhaps common names could be used in the title to give better understanding

Line 20 first sentence of the abstract runs on. Please shorten.

Line 21 'cardiac' and/or 'vascular'?

Line 20-23 long and confusing sentence, please re-write

Line 28 remove reach

Line 29 remove how was or change how to 'what'

Line 33-36 please re-write and/or explain sentence

Line 35 run on sentence rephrase

Line 36 'non myocardial' and non-myocardial are both used in the review. Please check throughout and choose one for consistency and in keeping with journal policy.

Line 40 is the issue derived from this review?

Line 45 change to tract

Line 46 furnished seems a strange choice of word

Line 51 change 'lost' to 'loss'

Line 51 there remain a large number of species with a compact myocardium. Perhaps 'most' is too severe? Could you 'many'? or qualify with % or numbers?

Line 51 the last sentence is really about future work – these are good to end the paper but not the abstract. I would suggest summarising the main findings of the work rather than the future directions.

Line 53 what is meant by 'second field of heart'? This has not yet been introduced.

Line 62 is a contents normal in a review in this journal? I haven't seen it before.

Line 100 as does any vertebrate OFT. What is interesting about fishes? E.g. blood pressure range, short dorsal aorta, single circuit circulation with no pulmonary.

Line 104 define 'chondrichthyans' and 'actinopterygians'

Line 113 change 'embracing'

Line 119 and 123 describe the concepts issues

Line 126 remove reach

Line 127 change how to what

Line 131-133 what does this sentence mean?

Line 150 Here a figure of phylogenetic tree would be useful to introduce the taxonomic groups and their relationships.

Line 153 change to varied widely

Line 159 'taxonomic'?

Line 160 phylogenetic tree could be used again

Line 189 'furnished' is repetitive (and occurs many times following)

Line 195 Is this concept 'established'? my understanding is that it is debated

- Line 211 insert comma after 'valves'; remove 'which' and replace with 'the valves'
- Line 212 change 'gives off' to 'gives rise to the..'
- Line 215 explain. Bulbus is highly specialised not merely rudimentary.
- Line 226 insert 'who pointed out'
- Line 231 poor sentence, please re-word
- Line 238 is cinematographic the correct term?
- Line 242 here I think it would be useful to have some images.... A basic image of what the inside of the conus and the bulbus look like... with the valves highlighted in the conus – I think this should come at Ln 170
- Line 249 reconsider 'decayed'
- Line 250 what is meant by 'historical facts'? please re-word.
- Line 252 this author? Grimes or yourselves?
- Line 255 what is special about the valves? Why not have just one?
- Line 285 remove 'to' and change 'mention' to 'mentioning'
- Line 290 change 'exposed' to 'discussed'
- Line 305 how is it distinct?
- Line 307 insert comma after heart and put probably in ()
- Page 15 – here again I think another figure/drawing would be useful. Something to show the positioning inside the pericardium of the different components... for people not overly familiar with this field it is hard to picture the transitions you are discussing. you can illustrate what is meant by proximal and distal to the Ventricle here too to engage more readers.
- Line 319 why this hypothesis? Does it have endothelial cells etc? if so are they aligned?
- Line 350 please give background/common names/phylogenetic tree
- Line 368 which markers
- Line 375 please add to phylogenetic figure
- Line 397 please reconsider 'supposition'
- Line 425 'and elastin'
- Line 439 remove ly from markedly
- Line 440 should be 'well developed'
- Line 441 add elopomorpha to phylogenetic tree
- Line 454 'in the caudo-cranial direction'
- Line 506 and 508 what are the conclusions that should be reconsidered. The reader should not have had to read this paper.

Line 508 Change to ‘There has been extensive...’

Line 510-512 needs background

Line 574 ‘proved’ is not very scientific

Line 578-581 is there any evidence for this?

Line 626 The authors may want to consider stating this proposal clearly at the beginning for clarity and then the section build to support the statement?

Line 659 – this section seems somehow out of place. Would it not be a good idea to explain the basic morphology o the whole heart earlier in the review?

Line 674 part A and B of figure 5 are backwards

Line 680 change to ‘During the subsequent years...’

Line 693 is the e meant to be on elastine

Line 699 remove ‘how is’ or change to ‘what’

Line 707 is ‘archaic’ the correct word?

Line 737 maybe include formal name (Gnathostomata)

Line 744 change ‘considered to ‘summarised’

Line 748-752 again phylogenetic tree would be usefull for historical relevance

Line 798 remove the first ‘the’

Line 807 gene

Line 822 insert ‘the’ before OFT

Line 828 change to: conceptions of heart morphology that hinder...

Line 829 could change early to ‘ancestral’ and modern to ‘derived’

Line 843 remove ‘basically’

Line 852 the sentence starting with ‘A worth mentioning finding...’ and the following sentence are interesting but are confusingly written. Please rephrase.

Line 885 reword ‘the notion derived’

Line 899 is this normal to have numbering throughout the conclusions? Consistent with the journal?

Line 916 maybe include formal name (Gnathostomata)

Line 917 change word ‘harboured’

Line 924 retained basic anatomical design of the heart despite speciation?

Line 926 change to ‘conus arteriosus concomitant with

Line 928 rephrase ‘has splitting into a wide range of structural variants’

Line 929 see about re MOST

Line 937 remove ‘still open’ and ‘or not’

Figure 3 needs a scale bar

Primera respuesta al editor

Dear Prof. Benton,

We thank you for your attention to our paper on the anatomical components of the cardiac outflow tract in chondrichthyans and actinopterygians. We have read carefully the comments of the Referees, and we appreciate very much the effort they have made to highlight aspects that should be re-evaluated, reconsidered, or modified in order to improve our work. In response to their suggestions, we have made a significant number of changes in our revised manuscript. We hope that, with the changes as shown in the new text, our manuscript will now be deemed suitable for publication in *Biological Reviews*. If necessary, of course, we are also ready to respond to further suggestions for improvement.

As for the major questions raised by the Referees, which you have highlighted in your decision letter, we would like to make the following comments.

1. We have tried to shorten the text as much as possible. Thus, for example, we have reduced section II (Historical View) by half. In addition, we have modified, removed, or moved several paragraphs to avoid any repetition. However, we have added some sentences to meet the demands of the Referees. One of the main changes that we have made is to gather all the information about the agnathans in a new section (VI), titled ‘The cardiac outflow tract of agnathans.’

2 and 3. Number of figures: We have introduced a new figure showing the phylogenetic relationships between the groups/clades mentioned in the text (Fig.1; section I). Referee 1 has provided a scheme of great quality, which we appreciate very much. We have studied it with great attention, but we have concluded that it is not representative enough of the evolutionary changes of the outflow tract of agnathans, chondrichthyans and actinopterygians. However, on the basis of this scheme, we have tried to propose another, more detailed scheme that illustrates what seems to have occurred in the different zoological groups included in our work. The resulting scheme was highly complicated due to the anatomical variations within each group especially if we take into account both the adults and embryos. Therefore, we have desisted to include it in the present revised version,

believing that it would not contribute to a better understanding of the main message of our work

4. Referee 1 considers that the manuscript contains insufficient information on the evolutionary origin of the conus arteriosus. Now, by concentrating the information about the agnathans in a single section (VI), it should be clear that, in our opinion, the conus originated in this zoological group, and not in the gnathostomes. This is also specified in the second conclusion of the present revised version.

Finally, in the acknowledgments section, we would like to express our gratitude to the anonymous reviewers, who have contributed significantly to the improvement of the present paper.

With many thanks again,

Yours sincerely

Prof. Borja Fernández PhD

Respuestas comunes a las preguntas de los revisores

We have read carefully the comments by the Referees, and we greatly appreciate their efforts in highlighting aspects of the initial submission that should be re-evaluated, reconsidered, or modified in order to improve the work. In response to this, we have introduced a significant number of changes in our manuscript, aiming to address their suggestions.

Following the recommendations of both Referees, we have tried to shorten the text as much as possible. For example, we have reduced section II (Historical View) by half. In addition, we have modified, removed, or moved several paragraphs to avoid any repetition. However, we have added some sentences to meet the demands of the Referees.

A recommendation of the Referees relates to the number of figures, which appears to be scarce. In this context, they believe that a phylogeny would be useful to guide readers and the development of the argument. Following this suggestion, we have introduced a new figure that shows the phylogenetic relationships between the clades mentioned in the text (Fig.1; section I). Referee 1 has provided a scheme of great quality, which we appreciate very much and which we have analyzed with great attention. We have concluded, however, that it is not representative enough of the evolutionary changes the cardiac outflow tract of

agnathans, chondrichthyans and actinopterygians. Basing on the scheme made by the Referee, we have tried to propose another, more detailed diagram illustrating what really seems to have occurred in the major zoological groups mentioned in our work. The resulting scheme was very complicated due to the anatomical variations within each group, especially if we take into account both the adults and embryos. Therefore, we have desisted to include it in the present version, believing that it would not contribute to a better understanding of the main message of our work.

Another major question raised by the Referees refers to the nomenclature used and opinions exposed by different authors, principally in the last two centuries. It does not seem appropriate for us to change what they wrote, even if their conclusions were not validated subsequently. Therefore, in the present revised version we have used quotation marks when we have transcribed expressions or personal opinions of other authors.

Referee 1 proposes to change the title of the review, replacing chondrichthyans and actinopterygians by fish. As we emphasized at the end of the new section I, the term fish is used in a general sense in different passages of the text, being aware that it designates a paraphyletic group of vertebrates. This clarification is absolutely necessary to avoid any criticism from specialists in Cladistics. The term fish comprises groups such as coelacanth and lungfishes that are not included in our review.

Referee 2 suggests that perhaps common names could be used in the title to give better understanding. This could be done. However, as stated in the instructions for authors, the journal only admits short titles (under 15 words). The title of our paper contains 12 words. Therefore, we have to keep it with no changes.

According to both Referees, the introduction (section I) is poor. They are not sure what the main focus of the paper is. Moreover, Referee 2 suggests the inclusion of a vertebrate phylogeny. We would like to specify that the main goals of our review are (1) to summarize from the historical viewpoint the main, often controversial concepts on the anatomical composition of the outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians, in an attempt to contribute to the simplification of the nomenclature of this cardiac region in vertebrates, (2) to gather the most up-to-date information to assess the evolutionary and embryonic origins of the outflow tract components, namely the conus and bulbus arteriosus, (3) to explore the changes that occurred in the outflow tract during evolution to set the anatomical condition exhibited by each extant major group of chondrichthyans and actinopterygians, and (4) to infer the primitive anatomical design of the heart of the jawed vertebrates. Therefore, we have introduced several changes in this section. It starts now

with a basic description of the fish heart, which we have removed from the section V of the first version. Then, we expose briefly the current controversies about the nomenclature and origin of the outflow tract components, and, subsequently, we specify the main objectives of our review. Finally, we present a diagram that shows the phylogenetic relationships between the groups included in our study.

Before answering in more detail the suggestions of each Referee, we want to point out that we have corrected all the grammatical errors that they have detected. In this context, it should be noted that some paragraphs containing some of their proposals have been deleted.

Primera respuesta al revisor 1

One of the main questions raised by the Referee concerns the evolutionary origin of the conus arteriosus and the bulbus arteriosus. In our opinion, there is enough evidence that a conus arteriosus is present in the agnathans. In our first version, we did not say that the conus is lacking in the jawless vertebrates. We wondered whether an outflow tract composed of both conus and bulbus really exists or has existed in them. We have read again the papers on the topic recommended by the Referee and we believe that our view is in agreement with the information contained in all of these works. We have now concentrated this information in a new section (VI) titled ‘the cardiac outflow tract of agnathans’, where we argue that in both the hagfish and lampreys, a conus must exist, at least during embryonic life, from which the outflow tract valves develop. In addition, the molecular information from lampreys reinforces the notion that the agnathans possess indeed a conus arteriosus. On the other hand, the evolutionary origin of the bulbus arteriosus remains an open question. There are no conclusive data in the literature substantiating that a true bulbus exists in the agnathans. In fact, recent work indicates that there is no bulbus in the hagfishes, while the information about the potential existence of a bulbus in the lampreys is really confusing. We have exposed and discussed these issues in the new section VI.

Another important point raised by the Referee concerns the application of consistent criteria to define the bulbus arteriosus. The Referee wonders that “if the chondrichthyan bulbus is different from the ventral aorta by different amounts of similar principal components, then why is the teleost bulbus not different from the non-teleost bulbus since it not only has different amounts of similar principal components, it also has great amounts of a new component-elastinb?” However, our position is not that the bulbus and the ventral

aorta are different only by different amounts of similar principal components. Additional evidence supports this difference. The bulbus is a cardiac component because it is located into the pericardial cavity. Moreover, the bulbus is covered by epicardium, similar to the other cardiac segments, and the coronary arteries, when they exist, follow the path of the bulbus (not the aorta) when penetrating the pericardial cavity. Finally, the morphogenetic mechanism leading to the formation of the bulbus is different to that leading to the ventral aorta. We believe that in the new version of the manuscript this idea is properly presented throughout the text, particularly in sections III and IV.

The Referee misses a bit more physiology of the outflow tract. This is undoubtedly a very interesting subject. However, if we would address the issue, the manuscript should be lengthened significantly, which is contrary to the general suggestion that the text should be shortened. We believe that the physiological aspects deserve an exhaustive review that has no place in the present work.

The Referee rightly indicates that we need to review the use of regression versus reduction. We have examined the whole text and, as a result, we now only use the term reduction (or decrease) when it refers to the size of a given anatomic element. Nevertheless, we have retained the term regression (in quotation marks) when referring to the suggestion of Smith (1918) about the conus arteriosus of teleosts (section II).

According to the Referee, the section II should be reduced to about half of its length. We understand that this section was somewhat verbose and confusing. However, it must be admitted that the literature from the two previous centuries on the outflow tract of the fish heart, most of which was written in German, was often very contradictory. However, we have followed the recommendation of the Referee, so we have reduced the section by half. As a result, the questions raised by the Referee should be solved.

Regarding the last paragraph of sub-section 3.1 (lines 385-389 of the first version), the Referee states that we should refer back to which historical concepts are consistent with the view that bulbus arteriosus existed from the onset of the actinopterygian radiation. If we should argue what historical concepts are consistent with this notion, the manuscript should be considerably lengthened. For this reason we have referred the reader to the work of Grimes (2015) which contains the information demanded by the Referee. He/she also considers that at this point of the manuscript more could be done to argue that the chondrichthyan bulbus arteriosus is in fact different from the ventral aorta. We do not understand this indication since the text refers only to ancient actinopterygians

(polypteriforms, acipenseriforms and lepisosteiformes), but no to chondrichthyans. In any case, a more detailed description of the chondrichthyan bulbus arteriosus and its difference with the ventral aorta has been included in sub-section 3.2 (lines 321-350 of the new version).

According to the Referee, we say that the presence of the bulbus arteriosus is contingent on the regression of the conus arteriosus, making the bulbus negatively defined (sub-section 3.2; lines 410-423 of the first version). Therefore, the Referee recommends making it positively defined by elaborating on what sets the bulbus arteriosus apart from the ventral aorta. In this aspect, we disagree with the Referee. What we explain in this part of the paper is that in sharks, sturgeons and teleosts (zebrafish), a non-myocardial segment, distinct from the already formed ventral aorta, appears at the distal (cranial) end of the outflow tract during embryonic life. This new segment, which is the precursor of the bulbus arteriosus, moves back the developing conus arteriosus. The conus and bulbus will then grow each one until its final size, which is species-specific. Therefore, we do not define the bulbus negatively. It is a new anatomical unit that, although similar in structure to the ventral aorta, it shows distinct anatomy, histology and embryonic development.

The Referee recommends condensing the sub-section 3.5 to at least half the current length, in particular in view of the purported finding of the second heart field in the tunicate *Ciona*. He/she considers that most likely, the second heart field also contributes to cardiogenesis in chondrichthyans which is also supported by the addition of *Isl1* to the forming heart of the lamprey (Kokubo et al 2010 *Evo & Dev*). We agree with the Referee that the findings in urochordates and lampreys (see the new last paragraph of the sub-section) are very suggestive but, in our opinion, they are not sufficient to infer the existence of a second heart field in the first gnathostomes. We have discussed this issue with several colleagues, all of whom agree that the information on the second heart field in different clades of vertebrates is necessary to understand the evolution of the outflow tract components in vertebrates. Anyway, we have shortened the sub-section by eliminating all the information that is not strictly necessary to give support to the hypothesis that there must be a second heart field in chondrichthyans.

According to the Referee, the section IV reaches a sensible conclusion, but would fare better if it discussed the principal reasons for making a distinction between the bulbus arteriosus and ventral aorta. He/she recommends considering again the importance of the outflow tract covered by epicardium in lampreys and - possibly - hagfish. However, the

section refers exclusively to the nomenclature of the components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians and not to those of agnathans or fish in general. Therefore, we have changed the title of the section (see the revised version). The issue of the agnathan OFT is now reviewed in a new chapter (VI). With respect to the differences between bulbus and aorta, we believe that it has been extensively exposed in section III, so that coming back to this topic in this section would be repetitive.

According to the Referee, section V needs to make clearer why discussions on the sinus venosus, atrium, and atrioventricular junction, is pertinent to the manuscript. In addition he/she demands to explore the arguments for that the arterial valve bearing myocardium of hagfish could be considered the precursor structure of the conus arteriosus. We agree with the Referee that the comments on the sinus venosus, atrium, and atrioventricular region were out of place. Therefore, these comments have been removed from section V and partially transferred to section I. However, we have preserved in section V the discussion of the notion that the primitive heart of the gnathostomates was composed of mixed myocardium. We believe that otherwise the reader might not understand our proposition that the spongy myocardium was not the primitive state and that its occurrence in several actinopterygians is due to the loss of the compact layer. As for the agnathans, the only comments that we have retained in the reviewed section V refer to their ventricular myocardium. The comments on their cardiac outflow tract including the valves appear now in the new section VI.

The Referee considers that the section VII (now section VIII) is quite verbose and could be reduced to half its length. He/she considers that the paragraph of lines 846-857 of the first version could be summarized as the tunicates appear to have a second heart field, so most likely chondrichthyans have as well. He/she proposes condensing this paragraph to 1-2 sentences and incorporate that in Section 3(5) dealing with the second heart field. According to the Referee, it seems that we suggest that the conus arteriosus of fish, mammals and birds may not be homologous, a notion that certainly goes against the majority view and must be backed up by arguments and references. Here, again, we have submitted this part of our work to the opinion of several colleagues, including physicians, and everyone believes that what we have written is useful for future research projects. It is true that tunicates seem to have the precursor of the second heart field of vertebrates, but what we point out is that the existence of this embryonic cardiogenic field in chondrichthyans must be still verified empirically. On the other hand, we do not say at all that the conus arteriosus of fish, mammals and birds may not be homologous. We are

convinced of this homology, but, as we suggest in our paper, stronger supporting evidence should be obtained, since many physicians do not share this point of view.

Specific comments

As we have said above, most of the specific issues raised by the Referee have been solved without any problem, following his/her suggestions. Several of these issues have even been rendered ineffective, as certain paragraphs have been eliminated following the demand of one or both of the Referee. Nonetheless, there are questions that deserve some comments.

The Referee considers that we have an unusual selection of components to the heart: if the atrioventricular region is included, should not the sinuatrial junction be included as well? The Referee is right in citing the works of Keith and Flack (1907), Jensen et al. (2017) and Kokubo et al. (2011) in relation to this question. However, to the best of our knowledge, there is no evidence in the literature supporting a specific identity of the sinu-atrial junction, whereas Icardo & Colvee (*Anat Rec.*, 2010) have explicitly stated that the atrioventricular region is a distinct segment of the heart. The findings of Kokubo and collaborators are in perfect agreement with the existence of the three regions of primary myocardium (sinus venosus, atrioventricular region and myocardial portion of the outflow tract) versus the two regions of working myocardium (atrium and ventricle) described by Moorman and Lamers (*Trends Cardiovasc Med*, 1994). However, that the sino-atrial junction (and not the whole sinus venosus) is a distinct region of the heart should be substantiated by histomorphological and embryological data.

The Referee thinks that we should clarify that there is one valve with two leaflets in the outflow tract of agnathans. As we argue in the new section VI, the existence of two leaflets in a primitive heart like that of agnathans should not be described as a bicuspid valve. This term is used to designate a congenital anomaly of the aortic and pulmonary valves in humans and other mammals. In the outflow tracts of fish and amphibians, each anatomical element preventing blood backflow to the ventricle is considered a morpho-functional unit, i.e. a valve. The pocket valves, which are by far the most frequent type in the zoological groups, consist of a leaflet and its supporting sinus. Therefore, in hagfish and lampreys there are two valves, and not a single valve with two leaflets. Otherwise, how should be named the valvular system of a shark where a high number of valves are distributed along the conus arteriosus. Thus, we disagree with Chapman et al., (1963),

Farrell (2007) and Icardo et al., (2016) by using the term bicuspid to describe the outflow tract valves of agnathans. Moreover, in agnathans, each leaflet is pocket-like, a morphology that is far from resembling a cuspid.

Regarding the formation of the conal valves, the Referee considers that the formative forces may indeed be illusive, but there is a substantial literature on flow perturbation in zebrafish development and it may also address valve maturation. To the best of our knowledge, the information about the formation of the heart valves in the zebrafish is broad, but it refers to the atrioventricular valves. The morphogenesis of the outflow tract valves, specifically the excavation of the mesenchymal cushions or crests in vertebrates remains an open question. Unfortunately, we cannot bring anything new on this issue. That is why we have included it in the current section VIII on future perspectives.

Primera respuesta al revisor 2

General comments

The main concerns of the Referee are the low number of figures used, particularly the lack of a phylogeny upon which various morphological traits are mapped. He/she also considers that the flow is sometimes confusing and repetitive, so the review is overly long, which is particularly evident in the earlier sections. In addition, the introduction as it stands is poor so that it should be rewritten with greater clarity and focus. The Referee would start off by including a basic vertebrate phylogeny at the start so the uninitiated can understand where the chondrichthyans and actinopterygians are and how they related to jawed vs jawless fishes. Practically all the main concerns of the Referee 2 coincide with those of Referee 1. As we have explained above, we have included a phylogenetic diagram of the groups cited in our review in the intruction (section I). In addition, we have significantly reduced the first parts of our work, especially section II (historical view). Finally, we have rewritten the introduction, specifying the aims of our work.

Specific comments

Most of the questions raised by Referee 2 have been solved successfully, following his/her suggestions. Several suggestions have even been rendered ineffective in eliminating certain paragraphs. Nevertheless, some questions deserve a comment.

Several aspects raised by the Referee refer to the abstract. We have rewritten it, following the suggestions of the Referee. The only problem we have found refers to the term ‘second heart field.’ The Referee says that it has not been defined previously, but we

think that it is an embryonic structure perfectly known nowadays, so it does not need to be defined in the abstract.

The Referee wonders what the sentence about the using of the term ‘fish’ means. As we have already pointed out, our preference is to emphasized at the end of the new section I that the term fish is used in a general sense in different passages of the text, being aware that it designates a paraphyletic group of vertebrates. In our opinion, this clarification is absolutely necessary to avoid any criticism from specialists in Cladistics.

Referring to the paper of Parsons (1930), the Referee suggests that we could include a figure illustrating the position of the cardiac components inside of the pericardial cavity (page 15 of the original version). First and foremost, we have to note that we have reduced notably the text concerning Parsons’ paper. Anyway, we are convinced that a figure would not clarify the issue, since Parsons did not accept the distinction between conus and bulbus arteriosus. Therefore, we think that the best a reader interested in the subject can do is to go to Parsons’ work, where the author included a number of illustrations of his numerous observations.

The Referee suggests that our proposal at the end of section IV (last paragraph of the section) might be moved to the beginning of the section and then build the section to support the statement. We understand the viewpoint of the Referee that building the section from an early statement may be easier for the reader to understand the coming text. However, it is our preference to start with data supporting the conclusion that now appear in the first part of the section. Then, we continue with details on the statement.

In agreement with Referee1, Referee 2 considers that the description of the heart segments is out of place. As we have exposed before, we have moved partially this description to the beginning of section I.

The Referee proposes to change early to ‘ancestral’ and modern to ‘derived’ (line 829 of the original version. ‘Early’ can be changed by ‘ancestral’. However, ‘modern’ cannot be substituted by ‘derived.’ In Cladistics, a character shows a primitive or a derived status, but a zoological group cannot be described as a ‘derived’ clade or taxon.

According to the Referee, the sentence starting with ‘A worth mentioning finding’ (line 852 of the original manuscript) and the following sentence are interesting but are confusingly written. Please rephrase. We have removed these sentences and have brought the information about the second heart field in tunicates to the subsection III-5.

Segunda respuesta del editor

A final review has appeared. The reviewer, who saw it before, has a number of final comments, one of which is substantive and concerns the interpretation of the recent paper by Moriyama et al. Their view is that this requires greater emphasis because of the significance of its findings. The referee also has a few other issues, but these are probably less significant. Please conduct a final revision, after which, I hope we can move forwards towards production.

Segunda respuesta del revisor 1

General comments

Despite the revision of segment III.4, “The bulbus arteriosus of the teleosts”, the discussion of the key findings of Moriyama et al (2016), a very important aspect of the manuscript, if not *raison d’être*, is still not satisfactory. To me, the most interesting finding of Moriyama et al (2016) is the observation that the presence of *elnb* changes the identity of part of the myocardial outflow tract to smooth muscle, that is changes the identity of the embryonic conal segment to an arterial segment, the bulbus arteriosus. That is possibly a different mechanism than one that gives different proportions to the conus and bulbus in the chondrichthyan heart (which may be achieved, albeit we don’t know, by different growth rates of the two segments and may not need change in identity). If the authors agree on the mechanism as described by Moriyama et al, it seems to me that the interpretations of Moriyama et al should carry more weight.

The phylogenetic tree (new Figure 1) is a valuable addition. Only, I would propose to include a tetrapod clade, or something to that effect, to include the terrestrial vertebrates.

I only had in mind a paragraph or two, less than 500 words, say, in order to lure in some physiologists in these important matters. However, a case in point for this is also the last sentence of the abstract, L50-51, where you use the term “most significant”. Such wording, to my mind, suggests functional impact. But what difference does it make to have a large bulbus rather than conus? I appreciate that we may not have a full answer, but you draw in physiology – as you should! - and thus you have to develop it. Also, see the next comment to the presence or absence of a distinct sinuatrial junction, which again is a discussion that can and must be partly rooted in physiology. “However, that the sino-atrial junction (and not the whole sinus venosus) is a distinct region of the heart should be substantiated by histomorphological and embryological data.”

Has that not been achieved, perhaps most recently by Tessadori et al (2012, PLoS ONE) and Jensen et al (2017, Sci Reports)? A hallmark feature of the atrioventricular canal is the delay it established between atrial and ventricular activation, but is it not also the case that distinct activations of the sinus venosus and the atria have been recorded as far down the phylogenetic tree as the hagfish (look up Satchell)? It seems to me that if you want to grant special status the one chamber junction, you have to grant similar status to other chamber junctions. You elevate the importance of this discussion to a place in the abstract (L43) and you should be more rigorous and thorough accordingly.

“As we argue in the new section VI, the existence of two leaflets in a primitive heart like that of agnathans should not be described as a bicuspid valve. This term is used to designate a congenital anomaly of the aortic and pulmonary valves in humans and other mammals.”

Bicuspid, tricuspid etc are merely descriptive terms and do not necessarily imply normal or abnormal morphogenesis. Indeed, bicuspid arterial valves is the most common congenital malformation to the human heart, but in my view that does not invalidate the use of term in other animals. The topic is biology and evolution, not medicine or veterinary medicine. A case in point for my argument is found in your own text: “a term which in mammals is used to designate the mitral valve and a congenital anomaly of the aortic and pulmonary valves.” (L659-660) Is it not so that the mitral can be bicuspid, irrespective of competence (healthy) or prolapse (normal-pathological)? I don’t see a reason for not calling the hagfish arterial valvar apparatus for a bicuspid valve.

Specific comments

Line 21-22 I propose you mention valve in this sentence otherwise the prevention of backflow is not clear for the uninitiated.

Page 4 the numbering and order of sections is wrong.

Line 518 you write “On the other hand” but the two parts so bridged are not in opposition, please amend.

Line 576 “the only way” – I do not agree, and this would be the place to use agnathans. Your section V is structured such that you work your way down the phylogenetic tree. Rather, you could go straight to the main point: which heart was likely present at the earliest gnathostome lineages. For that you need the shared primitive condition of gnathostomes and the condition of the agnathans. Besides “the only way”, this is mostly a matter of style. But consider how you star Section VI: “to infer the evolutionary origin of the OFT

components of gnathostomes, the condition of the cardiac-aortic junction in agnathans must be taken into account". YES! You could use the same approach in Section V!

Line 661 the word "appropriate" seems, well, inappropriate in discussions of likely evolutionary scenarios. In this part, I would recommend considering what is the most parsimonious scenario: that the hagfish have a primitive/poorly developed conus, or that hagfish have a conus and that structure was subsequently lost and the conus evolved within lampreys and gnathostomes. It seems to me that the first scenario is the simplest, and for that reason alone, is the most likely. I am not sure this scenario requires a well-developed conus in extinct hagfishes (Line 676-678).

Line 690 The presence, or absence, of a bulbus arteriosus....

Line 699 by "remain unknown" you imply this is an issue that cannot be resolved, but obviously, it can!

Segunda respuesta al editor

Dear Professor Benton,

We thank you again for your attention to our manuscript ID BRV-08-2017-0176.R1 entitled "The anatomical components of the cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians". We have read carefully the new comments of Referee 1, and we appreciate very much the effort he, or she, has made to improve our work.

As you highlight, the most substantive comment of the Referee concerns the interpretation of the recent paper of Moriyama et al. We have responded extensively to this comment, and have introduced thoughtful changes in the text that we hope will satisfy the Referee. We also have commented and tried to conform, as far as possible, the other suggestions raised by the Referee. There are, however, a few, in our opinion minor aspects that we have not been able to address according to the demands of the Referee, the justification of which are also included.

We hope that, with the changes as shown in the revised text, our manuscript will now be deemed suitable for publication in Biological Reviews.

With many thanks again to the Referee, and to you for special attention to our paper,

Sincerely yours

Professor Borja Fernández

Segunda respuesta al revisor 1

General comments

Despite the revision of segment III.4, “The bulbus arteriosus of the teleosts”, the discussion of the key findings of Moriyama et al (2016), a very important aspect of the manuscript, if not *raison d’être*, is still not satisfactory. To me, the most interesting finding of Moriyama et al (2016) is the observation that the presence of *elnb* changes the identity of part of the myocardial outflow tract to smooth muscle, that is changes the identity of the embryonic conal segment to an arterial segment, the bulbus arteriosus. That is possibly a different mechanism than one that gives different proportions to the conus and bulbus in the chondrichthyan heart (which may be achieved, albeit we don’t know, by different growth rates of the two segments and may not need change in identity). If the authors agree on the mechanism as described by Moriyama et al, it seems to me that the interpretations of Moriyama et al should carry more weight

We are sorry, but the findings of Moriyama et al. (2016), which are undoubtedly of great importance, were not the “*raison d’être*” of our work. We are totally convinced that they constitute an unquestionable advance in the knowledge on the evolution of the cardiac outflow tract of fish. However, they were not the main objective of our review, which was focused on chondrichthyans and all actinopterygians. In this context, the paleontological finding of Maldanis et al. (2016) has been the other huge recent discovery, showing that the early teleosts possessed a conspicuous conus arteriosus with five transverse rows of valves. To this work we have given the same weight as to that of Moriyama et al.

As described by Hu et al. (2000), the embryonic cardiac outflow tract of the zebrafish, which belongs to a relatively modern group of teleosts (Cypriniformes), shows a myocardial character at the beginning of the heart development. This also occurs in other actinopterygians like the Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii* (Gurrero et al., 2004) and in chondrichthyans like the Atlantic sawtail catshark, *Galeus atlanticus* (Rodríguez et al., 2013). Thereafter, the anterior (cranial) end of the outflow tract loses its myocardial character due to the appearance of a new outflow tract component, the bulbus arteriosus, distinct from the already formed ventral aorta and derived from the embryonic second heart field (see Zhou et al. 2011). The developing bulbus becomes interposed between the aorta and the myocardial conus arteriosus (see Grimes and 2006). The SEM micrographs obtained by Icardo (2006; pg 906) demonstrate unequivocally that the embryonic conus arteriosus of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, a teleost of the modern group of the

Perciformes, is subject to a negative allometry with regard of the developing bulbus arteriosus. The embryonic formation of the cardiac outflow tract, characterized by the appearance of a myocardial component and, subsequently, of another, nonmyocardial component derived from the second heart field seems to be a conserved event among vertebrates. Indeed, it occurs in chondrichthyans, early actinopterygians, mammals (Anderson et al., 2012; Cardiovasc. Res.) and teleosts.

In teleosts, as in other groups, the bulbus forms later than the conus. The latter remains reduced in size, while the former grows markedly until reaching its relative large size. In our opinion, the findings of Moryama and collaborators demonstrate that the appearance of *elastinb* in the bulbus arteriosus of teleosts has been a key factor in specializing their cardiac function, contributing to the explosive radiation of this fish group in the aquatic environment. We believed we had made it clear in our past review. Nevertheless, we still wonder how Moryama et al. would explain the total absence of elastin in the “bulbus arteriosus” of some Antarctic teleosts (Icardo et al., 1999 a,b in our list of references). Therefore, the question is: do they have a true bulbus, or is that the bulbus, as such, does not have to contain elastin to be a bulbus?

In any case, we fully recognize the value of the work of Moriyama and collaborators, and following the suggestion of the Referee, we have decided to comment more extensively their paper (Chapter III, Section 4). After more than two centuries of discussions on the identity of the teleostean bulbus, the findings of Moriyama et al. deserve really to be underlined.

The phylogenetic tree (new Figure 1) is a valuable addition. Only, I would propose to include a tetrapod clade, or something to that effect, to include the terrestrial vertebrates.

We can assure that when we designed the phylogenetic tree, we evaluated the possibility of adding the tetrapods. However, we gave up on this, because this forced us to include the sarcopterigyans (coelacanth, dipnoi + tetrapods). Coelacanth and dipnoi are usually included within the paraphyletic group of fish, and it is obvious that we have left them aside. Otherwise, our work would have resulted much longer than allowed. Moreover, if we include the sarcopterigyans in the dendrogram, any reader will wonder what happens with them, especially with coelacanth and dipnoi. Current information about the cardiac outflow tract of coelacanth is scarce. It is known that they possess a conus arteriosus and a bulbus arteriosus of similar size. The situation in dipnoi is much more complex, since the composition of their cardiac outflow tract widely vary between species. Taking into account

that the dendrogram must serve to follow what is exposed in the text, we believe it is better not to include more information than necessary.

“We believe that the physiological aspects deserve an exhaustive review that has no place in the present work place in the present work.”

I only had in mind a paragraph or two, less than 500 words, say, in order to lure in some physiologists in these important matters. However, a case in point for this is also the last sentence of the abstract, L50-51, where you use the term “most significant”. Such wording, to my mind, suggests functional impact. But what difference does it make to have a large bulbus rather than conus? I appreciate that we may not have a full answer, but you draw in physiology – as you should! - and thus you have to develop it. Also, see the next comment to the presence or absence of a distinct sinuatrial junction, which again is a discussion that can and must be partly rooted in physiology.

We greatly appreciate the suggestion of the Referee about introducing comments on the physiology of the bulbus arteriosus. However and once again, we have to say that, as stated in the title, our manuscript refers to the anatomy and not the physiology of the cardiac outflow tract components of chondrichthyans and actinopterygians. In this regard, it must be taken into account that knowledge on the physiology of the the bulbus arteriosus of chondrichthyans and early actinopterygians is still scarce. Most information on this issue refers to teleosts. Bearing this in mind, we have tried to summarize the main aspects of the function of the teleostean bulbus at the end of Chapter III, Section 4 (L484-L496).

“However, that the sino-atrial junction (and not the whole sinus venosus) is a distinct region of the heart should be substantiated by histomorphological and embryological data.”

Has that not been achieved, perhaps most recently by Tessadori et al (2012, PLoS ONE) and Jensen et al (2017, Sci Reports)? A hallmark feature of the atrioventricular canal is the delay it established between atrial and ventricular activation, but is it not also the case that distinct activations of the sinus venosus and the atria have been recorded as far down the phylogenetic tree as the hagfish (look up Satchell)? It seems to me that if you want to grant special status the one chamber junction, you have to grant similar status to other chamber junctions. You elevate the importance of this discussion to a place in the abstract (L43) and you should be more rigorous and thorough accordingly.

We have tried to summarize the findings on the sinuatrial junction in teleosts in the second paragraph of the introduction, giving them the same importance as the atrioventricular region. However, as stated by Tessadori et al (2012), their findings refer to

‘an evolutionary conserved, structural and molecular distinguishable component of the cardiac conduction system in a lower vertebrate’. Currently, however, this component is not yet recognizable in external view as is the atrioventricular region in all fish. Therefore, we cannot include the sinuatrial junction in the abstract given that its special characteristics have only been shown in teleosts. Instead, the existence of an anatomical region ‘supporting the atrioventricular valves’ can be recognized in all chondrichthyans and actinopterygians.

“As we argue in the new section VI, the existence of two leaflets in a primitive heart like that of agnathans should not be described as a bicuspid valve. This term is used to designate a congenital anomaly of the aortic and pulmonary valves in humans and other mammals.”

Bicuspid, tricuspid etc are merely descriptive terms and do not necessarily imply normal or abnormal morphogenesis. Indeed, bicuspid arterial valves is the most common congenital malformation to the human heart, but in my view that does not invalidate the use of term in other animals. The topic is biology and evolution, not medicine or veterinary medicine. A case in point for my argument is found in your own text: “a term which in mammals is used to designate the mitral valve and a congenital anomaly of the aortic and pulmonary valves.” (L659-660) Is it not so that the mitral can be bicuspid, irrespective of competence (healthy) or prolapse (normal-pathological)? I don’t see a reason for not calling the hagfish arterial valvar apparatus for a bicuspid valve.

The terms unicuspid, bicuspid, tricuspid quadricuspid, or perhaps better unifoliate, bifoliate, trifoliate, and quadrifoliate used to describe the condition of the aortic and pulmonary valves come from the medical point of view to indicate that the valves are composed of one to four leaflets (cusps), respectively, each supported by its own sinus. From the medical perspective, these terms are really relevant since they denote normal versus abnormal anatomical conditions.

Since Leonardo da Vinci, it has been accepted that tricuspid or trifoliate is the normal condition of both arterial valves. From the zoological viewpoint, however, a tricuspid aortic valve, for example, is a complex built by three valves that act in a coordinated way. In a given shark species there may be several rows of valves along the conus. In fact, each of these valves is a functional unit. In such case, the set of ten, twenty, thirty etc. valves cannot be named following the medical notion of outflow tract valves. In fish, amphibians and reptiles, the number, shape, size and spatial distribution of the outflow tract valves notably vary between species. Therefore, in our opinion the terms bicuspid, tricuspid etc. are far from being mere descriptive terms. This is why we believe that the use

of “bicuspid aortic valve” to name the set of two valves in hagfishes is not appropriate. Curiously, Icardo et al. (2016) used the term bicuspid valve to describe the valves of the hagfish, while he had applied the zoological concept in his previous reports on the cardiac outflow tract valves of fish. Anyway, we have valued the need to maintain the comment on the use of the term bicuspid, concluding that, in fact, it is not highly relevant with regard to the main message of our work. Therefore and in order to avoid any unfruitful controversy, we have decided to delete our comment.

Specific comments

L21-22: I propose you mention valve in this sentence otherwise the prevention of backflow is not clear for the uninitiated.

Done.

P4: the numbering and order of sections is wrong.

Amended.

L518: you write “On the other hand” but the two parts so bridged are not in opposition, please amend.

The expression has been deleted.

L576: “the only way” – I do not agree, and this would be the place to use agnathans. Your section V is structured such that you work your way down the phylogenetic tree. Rather, you could go straight to the main point: which heart was likely present at the earliest gnathostome lineages. For that you need the shared primitive_condition of gnathostomes and the condition of the agnathans. Besides “the only way”, this is mostly a matter of style. But consider how you start Section VI: “To infer the evolutionary origin of the OFT components of gnathostomes, the condition of the cardiac-aortic junction in agnathans must be taken into account”. YES! You could use the same approach in Section V!

Amended.

L661: the word “appropriate” seems, well, inappropriate in discussions of likely evolutionary scenarios. In this part, I would recommend considering what is the most parsimonious scenario: that the hagfish have a primitive/poorly developed conus, or that hagfish do not have a conus and that structure was subsequently lost and the conus evolved within lampreys and gnathostomes. It seems to me that the first scenario is the simplest, and for that reason alone, is the most likely.

I am not sure this scenario requires a well-developed conus in extinct hagfishes (L676-678).

By eliminating the paragraph on the notion of bicuspid valve, this question is already solved.

L690: The presence, or absence, of a bulbus arteriosus.

Done

L699: by “remain unknown” you imply this is an issue that cannot be resolved, but obviously, it can!

Amended



The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance

Cristina Rodríguez^{a,b}, Miguel Lorenzale^{a,b}, Miguel A. López-Unzu^{a,b}, Borja Fernández^{a,b}, Francisca Salmerón^c, Valentín Sans-Coma^a, Ana C. Durán^{a,b,*}

^a Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España

^b Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España

^c Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Málaga, Fuengirola, 29640 Málaga, España

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2017

Received in revised form 25 May 2017

Accepted 26 May 2017

Available online 3 June 2017

Keywords:

Bulbus arteriosus
Cardiac outflow tract
Heart
Holocephali
Pigmentation

ABSTRACT

This study was designed to determine whether the outflow tract of the holocephalan heart is composed of a myocardial conus arteriosus and a non-myocardial bulbus arteriosus, as is the case in elasmobranchs. This is a key issue to verify the hypothesis that these two anatomical components existed from the onset of the jawed vertebrate radiation. The Holocephali are the sister group of the elasmobranchs, sharing with them a common, still unknown Palaeozoic ancestor. The sample examined herein consisted of hearts from individuals of four species, two of them belonging to the Chimaeridae and the other two to the Rhinchi-maeridae. In all specimens, the cardiac outflow tract consisted of a conus arteriosus, with myocardium in its walls and two rows of valves at its luminal side, and an intrapericardial bulbus arteriosus shorter than the conus and devoid of valves. The bulbus, mainly composed of elastin and smooth musculature, was covered by the epicardium and crossed longitudinally by coronary artery trunks. These findings give added support to the viewpoint that the outflow tract of the primitive heart of the gnathostomes was not composed of a single component, but two, the conus and the bulbus. All rabbitfish (*Chimaera monstrosa*) examined had pigment cells over the surface of the heart. The degree of pigmentation, which varied widely between individuals, was particularly intense in the cardiac outflow tract. Pigment cells also occurred in the bulbus arteriosus of one of the two hearts of the straightnose rabbitfish (*Rhinchi-maera atlantica*) included in the study. The cells containing pigment, presumably derived from the neural crest, were located in the subepicardium.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Recent work has shown that the outflow tract of the elasmobranch heart, namely the cardiac portion located between the ventricle and the ventral aorta, does not consist of a single component, the conus arteriosus, as has been assumed for decades, but two, the myocardial conus arteriosus and the non-myocardial bulbus arteriosus (Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2013). This statement is based on the results from studies of adult (Durán et al., 2008) and embryonic (Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2013) hearts of Atlantic sawtail catsharks (*Galeus atlanticus*). The embryological findings have proved that the bulbus is not a mere backward extension of the ventral aorta into the pericardial cav-

ity or a modification of the anterior part of the developing conus arteriosus, as proposed in classic papers (reviewed in Durán et al., 2008). The elasmobranch bulbus is a cardiac outflow tract component homologous to the actinopterygian bulbus arteriosus (Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2013).

Gross anatomical observations in species belonging to several elasmobranch groups substantiate that in sharks and batoids the cardiac outflow tract is regularly composed of a conus and a bulbus (Durán et al., 2008; Borucinska et al., 2012; Rodríguez et al., 2016). This has led to the hypothesis that the cardiac outflow tract consisted almost certainly of a conus and a bulbus from the onset of the jawed vertebrate radiation (Durán et al., 2008). In this regard, knowledge of the cardiac outflow tract anatomy of Holocephali is relevant, as it might provide evidence for or against this hypothesis, given that they are the sister group of the elasmobranchs. There is general agreement that both taxa share a common, still unknown Palaeozoic ancestor (Didier, 2004; Lund and Grogan, 1997; Grogan and Lund, 2004; Inoue et al., 2010).

* Corresponding author at: Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España.
E-mail address: acduran@uma.es (A.C. Durán).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.zool.2017.05.008>

0944-2006/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Comentarios de los revisores en la publicación 2

The bulbus arteriosus of the holocephalan heart: gross anatomy, histomorphology, pigmentation, and evolutionary significance

El bulbo arterioso del corazón de los holocéfalos: anatomía macroscópica, histomorfología, pigmentación y significado evolutivo

Cristina Rodríguez, Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, Borja Fernández, Francisca Salmerón, Valentín Sans-Coma, Ana C. Durán
Zoology (2017), 123: 37–45 doi: 10.1016/j.zool.2017.05.008.

Respuesta del editor

Dear Professor. Durán,

Thank you for submitting your manuscript to Zoology. I have received comments from reviewers on your manuscript. Your paper should become acceptable for publication pending suitable minor revision and modification of the article in light of the appended reviewer comments.

When resubmitting your manuscript, please carefully consider all issues mentioned in the reviewers' comments, outline every change made point by point, and provide suitable rebuttals for any comments not addressed.

I look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible.

Kind regards,

Dr Hernandez

Editor

Zoology

Respuesta del revisor 1

General comments

The study by Durán et al. investigates hearts of holocephalans because, as they rightly emphasize, “Knowledge about the morphology of the holocephalan heart is scarce”. However, the focus of the study is actually the vessel segment between the ventricle and the ventral aorta, although a study of the entire would also have been valuable. Durán et al. has great expertise in piscine cardiac anatomy and the study is well-executed, clearly presented and concisely written. The study importantly and unambiguously demonstrates the presence of both a conal and a bulbar segment to the cardiac outflow tract.

Specific comments

Introduction, first paragraph. “intercalated” usually refers to between layers and thus seems like an odd term regarding the outflow tract. Results, first paragraph. The proximal outflow tract is describe as arising from the middle of the anterior part of the ventricle.

However, the hearts look typically asymmetrical with a somewhat left-sided atrium and a somewhat right-sided origin of the outflow from the ventricle. Please confirm your statement or amend. Results, third paragraph. A sinus is a cavity, so I don't see how that can be a “supporting structure”. Besides mentioning the three principle layers, please indicate thicknesses either in absolute values or relative terms. Please indicate in Table 1 that the specimens are of *C. monstrosa*. Discussion, third paragraph. “Comparing our observations with those of Durán et al. (2008) in *Galeus atlanticus*” please briefly summarize the pertinent findings of Durán et al. (2008). Last paragraph of section 4.1: the functional implications drawn by Icardo et al were not based on experiments as far as I can tell. If the authors agree, I propose those two references are not pertinent in this part. Last paragraph of section 4.2: the description of the heart of the blue fish by Anthony et al (1965) indeed reveals a substantial conus arteriosus but the length of the conus and the bulbus are roughly equal and certainly not the same as the much-skewed proportions reported in the submission for the Holocephalans – please amend. Section 4.3 second paragraph: “The application of standard techniques to identify the type of pigment in the gray bichir (Reyes-Moya et al., 2014) was unsuccessful, probably because of the condition of the material examined.” Please explain or elaborate, given the tissue of *C. monstrosa* appears well fixed as it showed clear immunological myocardial detection (Fig. 1F).

Respuesta del revisor 2

General comments

Thorough analysis, although I was not sure why use the nitrous oxide indicator, and what was the specific result of this technique. I don't feel that was adequately explained.

Specific comments

Minor typos: *Hydrolagus* is misspelled once (pg. 3 last paragraph); should say "highly unlikely" (pg. 9 last sentence of 2nd full paragraph); Capitalize Holocephali (pg. 3 second paragraph)

Use standard common names:

Hydrolagus affinis = small-eyed chimaera

Harriotta raleighana = Narrow-nose chimaera

Rhinochimaera atlantica = Atlantic longnose chimaera

Respuesta al editor

Dear Dr. Hernandez,

We thank you for your attention to our paper (ZOOLOGY_2017_19) describing the bulbus arteriosus of the holocephalan heart. We have read carefully the comments of the Reviewers, and we appreciate very much the effort they have made to highlight aspects that should be reconsidered, or modified in order to improve our work. In response to their suggestions, we have introduced several changes in our revised manuscript. We hope that, with the changes as shown in the reviewed text, our manuscript will now be deemed suitable for publication in *Zoology*. If necessary, of course, we are also ready to respond to further suggestions for improvement.

With many thanks again,

Sincerely, yours

Respuesta al revisor 1

According to the Reviewer, “intercalated” usually refers to between layers and thus seems like an odd term regarding the outflow tract.

Therefore, we have replaced “intercalated” by “located”.

Results, first paragraph. The proximal outflow tract is described as arising from the middle of the anterior part of the ventricle. However, the hearts look typically asymmetrical with a somewhat left-sided atrium and a somewhat right-sided origin of the outflow from the ventricle. Please confirm your statement or amend.

This has been clarified at the beginning of section 3.1.

Results, third paragraph: a sinus is a cavity, so I don't see how that can be a “supporting structure”.

The Reviewer is right in saying that the sinus is a cavity. We believed, however, that the sinus of a valve had been already thoroughly described in both the tetrapods and fish. In elasmobranchs, the sinus of a conal valve was defined as a hollow portion of the conus arteriosus wall, whose border supports a leaflet in a parabolic fashion (Sans-Coma et al., 1995). Nonetheless and to avoid potential confusion, we have tried to clarify this issue in the third paragraph of section 3.1 (Results).

Besides mentioning the three principle layers, please indicate thicknesses either in absolute values or relative terms.

This request has been solved in the present version: see, please, the third paragraph of section 3.1.

The Reviewer indicates that in Table 1, the specimens are of *C. monstrosa*.

The name of the species has been added in the present version.

Discussion, third paragraph. “Comparing our observations with those of Durán et al. (2008) in *Galeus atlanticus*” please briefly summarize the pertinent findings of Durán et al. (2008).

We have added a new sentence summarizing the pertinent findings of Durán et al. (2008).

Last paragraph of section 4.1: The Reviewer considers that the functional implications drawn by Icardo et al. were not based on experiments. He/she proposes to delete these two references in this part.

We agree with this proposal, so that that we have removed both references.

Last paragraph of section 4.2: the description of the heart of the blue fish by Anthony et al (1965) indeed reveals a substantial conus arteriosus but the length of the conus and the bulbus are roughly equal and certainly not the same as the much skewed proportions reported in the submission for the Holocephalans please amend.

The Reviewer is absolutely right. We have rectified this mistake in the present version.

Section 4.3 second paragraph: “The application of standard techniques to identify the type of pigment in the gray bichir (Reyes-Moya et al., 2014) was unsuccessful, probably because of the condition of the material examined.” Please explain or elaborate, given the tissue of *C. monstrosa* appears well fixed as it showed clear immunological myocardial detection (Fig. 1F).

The fact is that after several attempts, the use of the Schmorl’and Lillie’s methods (see Reyes-Moya et al., 2014) gave no positive results in our specimens. However, the Reviewer is right in considering that the condition of the material examined cannot adequately explain this event. Therefore, we have changed the text indicating that we have no satisfactory explanation for the fact (second paragraph of section 4.3), which is the pure reality.

Respuesta al revisor 2

I was not sure why use the nitrous oxide indicator, and what was the specific result of this technique. I don't feel that was adequately explained.

We have tried to clarify this issue in the second paragraph of section 4.1 (Discussion).

Hydrolagus is now correctly written (pg. 3, last paragraph).

"highly unlikely" (pg. 9 last sentence of 2nd full paragraph) is now correctly written.

Page 3, second paragraph: Holocephali has been capitalized.

The Reviewer proposes common names for three of the four species examined different from those we have used in our paper. In this regard, we have consulted the FishBase with the following results:

Hydrolagus affinis = smalleyed rabbitfish, also accepted by the FAO, instead small-eyed chimaera as proposed by the Reviewer.

Harriota raleighana = Pacific longnose chimaera, also accepted by the FAO, instead narrow-nose chimaera as proposed by the Reviewer.


Rhinochimaera atlantica = straightnose rabbitfish, also accepted by the FAO, instead Atlantic longnose chimaera as proposed by the Reviewer.

Under these circumstances, we have maintained the common names given by the FishBase in the revised version, though we are totally open to change them by those proposed by the Reviewer in the case he/she indicates us a more reliable source of standard names.

Moreover, the Reviewer recommends the use of the standard names in the text. However, after having cited the common name of each species (introduction, and materials and methods), our preference is to use its scientific name throughout the text. We believe that the (long) common names of the species included in our study are much more difficult to retain by the readers than the scientific names.

With these changes, we hope that our revised version will be deemed suitable for publication in Zoology. If necessary, of course, we are also ready to respond to further suggestions for improvement.

The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes): Anatomical, histological and evolutionary aspects

Miguel Lorenzale¹ | Borja Fernández^{1,2,3}  | Ana Carmen Durán^{1,2} |
Miguel A. López-Unzu^{1,2} | Valentín Sans-Coma^{1,2}

¹Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Málaga, Málaga, Spain

²Biomedical Research Institute of Málaga (IBIMA), University of Málaga, Málaga, Spain

³CIBERCV Enfermedades Cardiovasculares, Málaga, Spain

Correspondence

Borja Fernández, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Málaga, Málaga, Spain.
Email: borjaf@uma.es

Funding information

Miguel A. López-Unzu is the recipient of fellowship FPU15/03209 (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Madrid, España); Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Spain) and FEDER funds, Grant/Award Number: CGL2017-85090-P

Abstract

The cardiac outflow tract of chondrichthyans is composed of the myocardial conus arteriosus, equipped with valves at its luminal side, and the bulbus arteriosus devoid of myocardium. Knowledge of the histomorphology of the conal valves is scarce despite their importance in preventing blood backflow to the heart. Current information on the subject refers to a single shark species. The present report is the first to describe the structure of the conal valves of a batoid species, namely, *Raja asterias*. Hearts from seven starry rays were examined using scanning electron microscopy and histochemical techniques for light microscopy. In all hearts, the conus showed four transverse rows of three pocket-like valves each. Each valve was composed of a leaflet and its supporting sinus. The leaflet had a stout central body, rich in glycosaminoglycans, which contained fibroblasts, collagen and elastin. The central body was surrounded by two thin fibrous layers, outer and inner, formed mainly by collagen. The valves of the anterior row, which were the largest of the valvular system, were attached proximally to the conus arteriosus and distally to the bulbus arteriosus, and not to the ventral aorta as previously reported for chondrichthyans. The arrangement of the anterior valves in the starry ray is an anatomical pattern that apparently has been preserved throughout the evolution of vertebrates.

KEYWORDS

Chondrichthyes, conal valves, conus arteriosus, heart, *Raja asterias*

1 | INTRODUCTION

The cardiac outflow tract of chondrichthyans, namely the intrapericardial portion of the heart interposed between the ventricle and the ventral aorta, consists of the conus arteriosus and the bulbus arteriosus (Durán et al., 2008; Lorenzale et al., 2018). The conus arteriosus is a contractile segment with myocardium in its walls and valves, the conal valves, at its luminal side. The bulbus arteriosus, which connects the conus arteriosus with the ventral aorta at the anterior boundary of the pericardial cavity, is devoid of cardiac muscle and valves; it is composed mainly of smooth musculature and elastin.

The interest in the conal valves of cartilaginous fish dates back more than two centuries. Early work was principally concerned with the number, shape, size and spatial arrangement of the valves (reviewed in Sans-Coma et al., 1995). Moreover, the function of the conus arteriosus and its valves has focused the attention of several authors (reviewed in Satchell & Jones, 1967, and Lorenzale et al., 2018). Nonetheless and despite the importance of the conal valves in preventing blood backflow into the ventricle, little attention has been paid to their histomorphology. The only paper devoted to this subject is that of Sans-Coma et al. (1995), who described the histological features of the conal valves of the lesser spotted

Comentarios de los revisores en la publicación 3

The valves of the cardiac outflow tract of the starry ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes)

Las válvulas del tracto de salida cardiaco de la raya estrellada, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes)

Miguel Lorenzale, Borja Fernández, Ana C. Durán, Miguel A. López-Unzu, Valentín Sans-Coma.

Anatomia Histologia Embryologia (2018) Oct 31. doi: 10.1111/ah.12409

Respuesta del editor

Dear Prof. Fernández:

Manuscript ID AHE-08-18-OA-133 entitled "The Valves of the Cardiac Outflow Tract of the Starry Ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes): Anatomical, Histological and Evolutionary Aspects" which you submitted to *Anatomia, Histologia, Embryologia*, has been reviewed. The comments of the referee(s) are included at the bottom of this letter.

The referee(s) have recommended some minor revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the referee(s)' comments and revise your manuscript.

Once again, thank you for submitting your manuscript to *Anatomia, Histologia, Embryologia* and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,

Prof. Francesco Abbate

Associate Editor, *Anatomia, Histologia, Embryologia*

Respuesta del revisor 1

General comments

The authors state they used seven hearts from "adult" rays, with no mention made of whether both sexes were represented. On Page 5, line 40, the phrase "against to the other two leaflets" should be corrected to read "against the other two leaflets." On the same page, line 50, there is a minor typo, "Te" instead of "The". On Page 6, lines 12-14, the authors assert that the leaflets consisted of Types I and III collagen; how was this determined? There is no indication of the use of any sort of immunolabeling to distinguish the two types definitively. On Page 6, Line 57, "Like in the spotted dogfish..." is more correctly phrase

"As in the spotted dogfish." On line 58, the phrase "against to the other two leaflets" is repeated and should be corrected. Moreover how did you determine the presence of Type I and II collagen, without the use of immunolabeling?

Respuesta al editor

Dear Prof. Abbate:

We thank you very much for your attention to our manuscript ID AHE-08-18-OA-133 entitled "The Valves of the Cardiac Outflow Tract of the Starry Ray, *Raja asterias* (Chondrichthyes; Rajiformes): Anatomical, Histological and Evolutionary Aspects".

We have read carefully the comments of Reviewer1, and we appreciate very much the effort he/she has made to improve our work. In response to this, we have introduced the necessary changes in our manuscript, aiming to address the suggestions of the Reviewer.

To highlight the changes in our reviewed version, we have used the track changes mode or using bold or colored text.

We hope that, with the changes as shown in the revised text, our manuscript will be deemed suitable for publication in *Anatomia, Histologia, Embryologia*.

Thanking you again for your courtesy,

Sincerely yours,

Prof. Borja Fernández

Respuesta al revisor 1

On Page 6, lines 12-14, the authors assert that the leaflets consisted of Types I and III. Moreover how did you determine the presence of Type I and II collagen, without the use of immunolabeling? Collagen; how was this determined? There is no indication of the use of any sort of immunolabeling to distinguish the two types definitively.

The main criticism by the Referee refers to our statement that the leaflets contain collagen of types I and III. First and foremost, we would like to specify that the nature of the collagen existing in the valves is far from being a key item in our study. Nonetheless, we agree with the Referee that the use of immunohistochemical techniques would have better identified the types of collagen, but this would not have contributed significantly to solving the main questions raised in our research. We used the method of Junqueira et al. (1979), namely picrosirius + polarization microscopy to verify the presence of collagen in the valves. As can be seen in figure 3B, staining with picrosirius plus polarization microscopy enhance

the natural birefringence of the bundles of collagen I (reddish) and collagen III (greenish), this according to Junqueira and collaborators. Timely comments have been added to the penultimate paragraph of the Results and to the legend of figure 3B.

The authors state they used seven hearts from "adult" rays, with no mention made of whether both sexes were represented.

The Referee is right to request the sex of the animals studied. We forgot to specify it. As we indicate in the reviewed version, there were four males and three females. In addition, we point out now that we found no sex differences with regard to the anatomy and histologmorphology of the valves.

On Page 5, line 40, the phrase "against to the other two leaflets" should be corrected to read "against the other two leaflets."

On line 58, the phrase "against to the other two leaflets" is repeated and should be corrected.

The phrase "against to the other two leaflets" has been corrected according to the suggestion of the Referee.

On the same page, line 50, there is a minor typo, "Te" instead of "The".

"Te" has been substituted by "The".

On Page 6, Line 57, "Like in the spotted dogfish..." is more correctly phrase "As in the spotted dogfish."

5. "Like in the spotted dogfish..." has been substituted by "As in the spotted dogfish..."



Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes)

Miguel Lorenzale^a, Miguel A. López-Unzu^a, M. Carmen Fernández^{a,b}, Ana C. Durán^{a,b}, Borja Fernández^{a,b}, M. Teresa Soto-Navarrete^a, Valentín Sans-Coma^{a,b,*}

^a Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Biomedical Research Institute of Málaga (IBIMA), University of Málaga, 29071 Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form 18 July 2016

Accepted 27 September 2016

Available online 28 September 2016

Keywords:

Heart

Bulbus arteriosus

Conus arteriosus

Heart pigmentation

Osteoglossum bicirrhosum

ABSTRACT

The cardiac outflow tract of chondrichthyans and actinopterygians is composed of a myocardial conus arteriosus and a non-myocardial bulbus arteriosus. In teleosts, the conus has been subjected to a reduction in size over the evolution in conjunction with the further development of the bulbus. Most studies on the outflow tract of the teleost heart refer to species of modern groups and are mainly devoted to the bulbus. Knowledge on the outflow tract of species belonging to early teleost groups is scarce. The aim here was to characterise the structure of the cardiac outflow tract of the silver arowana, a representative of the ancient teleost clade of the Osteoglossomorpha. The material consisted of hearts from six juvenile animals. The cardiac outflow tract of the silver arowana is composed of a conus, which supports two conal valves, and a bulbus. Both components are lined externally by the epicardium and internally by the endocardium. The conus is immunoreactive to antibodies against myosin heavy chains and is composed of compact myocardium, thus contrasting with the ventricle, which has exclusively trabeculated myocardium. The bulbus is immunoreactive to antibodies against smooth muscle α -actin and mainly consists of elastic fibres and smooth muscle cells, both arranged in three layers, outer, middle and inner. The most remarkable feature of the bulbus is the presence of two prominent longitudinal ridges, dorsal and ventral, at the luminal side, which serve to anchor the commissures of the conal valves. This arrangement has not been described so far in any fish species. Pigment cells, presumably of neural crest origin, are present in the subepicardium of the bulbus and anterior part of the ventricle.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Knowledge of the outflow tract (OFT) of the fish heart has progressed substantially in recent years. Work done in species of different groups has changed the classic view that the cardiac OFT of chondrichthyans consists exclusively of a myocardial conus arteriosus, while in actinopterygians a non-myocardial bulbus arteriosus has replaced the conus arteriosus. Currently, it is well known that the cardiac OFT of both the Holocephali (Durán et al., 2010, 2015) and elasmobranchs (Durán et al., 2008; Rodríguez et al., 2013) is composed of a conus arteriosus well-developed in size, followed

cranially by a bulbus arteriosus. The conus has myocardium in its walls and is furnished with valves at its luminal side, whereas the bulbus is devoid of myocardium and valves. A patent conus arteriosus coexisting with a more or less large bulbus arteriosus exists in species belonging to all ancient clades of recent actinopterygians: Polypteriformes (Grimes and Kirby, 2009; Grimes et al., 2010; Durán et al., 2014), Acipenseriformes (Icardo et al., 2002a,b; Guerrero et al., 2004; Grimes et al., 2010), Lepisosteiformes (Grimes and Kirby, 2009; Grimes et al., 2010) and Amiiformes (Boas, 1880; Goodrich, 1930; Grimes and Kirby, 2009; Grimes et al., 2010).

Studies carried out more than one century ago (Boas, 1880; Senior, 1907a,b,c) showed that in teleosts of the genera *Albula*, *Pterothrissus* and *Megalops* (= *Tarpon*), all belonging to the ancient clade of the Elopomorpha, there is a conspicuous conus arteriosus that supports two transverse rows of valves, followed by a well-developed bulbus arteriosus. In most teleosts, however, there is a

* Corresponding author at: Biomedical Research Institute of Málaga (IBIMA), University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.

E-mail address: sanscoma@uma.es (V. Sans-Coma).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.zool.2016.09.004>

0944-2006/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Comentarios de los revisores en la publicación 4

Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterisation of the cardiac outflow tract of the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes)

*Caracterización anatómica, histoquímica e inmunohistoquímica del tracto de salida cardíaco de la arawana plateada, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes)*

Miguel Lorenzale, Miguel A. López-Unzu, M. Carmen Fernández, Ana C. Durán, Borja Fernández, M. Teresa Soto-Navarrete, Valentín Sans-Coma
Zoology (2017), 120: 15-23 doi: 10.1016/j.zool.2016.09.004

Primera respuesta del editor

Dear Prof. Valentín Sans-Coma,

Reviewers have now commented on your paper. One reviewer in particular has offered some excellent ideas for improving the manuscript. I look forward to seeing your revisions. It will be re-reviewed by the same reviewers if possible. I can find no valid use of the common name 'arawana' and would like you to either use the accepted spelling of 'arowana' or leave out common names altogether.

Yours sincerely,

Adam P. Summers

Editor Zoology

Primera respuesta del revisor 1

General comments

This manuscript reports on a systematic, histological study of the outflow tract of a basal teleost, the silver arowana. Main findings are related to the presence of both conus arteriosus and bulbus arteriosus, and of conus leaflets that anchor distally to two prominent longitudinal ridges. The paper is an interesting addition to our knowledge of the OFT of basal teleost, but it cannot be accepted for publication in the present form, and needs major rearrangement and revision.

A major problem with the manuscript is that the conal insertion of the conal valves is not unequivocally demonstrated. Conal insertion of the leaflets is only seen, and just on one side, in figure 6E. Figures 3 and 4 show that the valve leaflets arise from the conus-bulbus

connective boundary. To follow with the argument, examination of figure 2 appears to indicate that the left leaflet is entirely situated in the bulbus while the situation of the right leaflet in relation to the conus is unclear (but probably similar) due to tissue folding. The authors should re-evaluate this and/or provide a panoramic view (to substitute figure 3) showing the conal anchoring of the valves.

In relation to the above comment, several descriptions seem to be equally unclear. Under the epigraph 3.2, lines 50-55, it is stated that the "myocardium of the conus was surrounded by connective tissue", and that "this connective tissue served to anchor the OFT valves". Conal valves are supposed to anchor to the inner side of the conus, not to the connective layer surrounding (encircling, on the external side) the conus myocardium. All the related light microscope images (except figure 6E) show that the leaflets anchor at the conus-bulbus connective boundary. Also, the authors appear to have unnoticed additional discrepancies between figures 3-4 and figure 6E. The latter image shows a tissue pad engrossing the conus wall and supporting the free leaflet. This is not seen in figure 4A. Is the tissue pad part of the valve? Or could it be an artifact due to the level/angle of sections? Please clarify.

In summary, what I am saying is that, based on the evidence presented, either the OFT valves of arowana arise from the conus-bulbus boundary and, hence, they are entirely bulbar (Figs. 2-4), or they consist of a double component, the tissue pad (which has not been considered) and the free leaflet (Fig. 6E). The former would be an unsuspected evolutionary novelty that may have profound phyletic implications and should merit a more elaborated preparation (including figure 2). The latter, a derivation of the situation found in more basal osteichthyes. In any case, I would suggest a SEM preparation depicting a longitudinal section through the midline of the leaflet(s) to show conus, bulbus and leaflets altogether.

Specific comments

Page numbers are most helpful and should be added.

Under epigraph 3.1, lines 20-24, color descriptions: red color may be due to blood content, especially in the ventricular chamber (?).

Also, lines 3-16 of the following page: a) The leaflet structure is not evident in figure 2. b) The geometrical description is overdone. It would be sufficient to state that the leaflets are pocket-like.

Under epigraph 3.2, lines 58-60, positivity to the A4.1025 Ab: The positivity in ventricle and conus appears to be just over background. Why is the staining more intense in the atrium?

Also, lines 9-24: a) Ridges are barely discernable in panels 5B-C. Perhaps, the small diameter of the ridges in cross-sections should have to be emphasized. b) At the base of the prominent ridge shown in figure 5E, all the elastin layers appear to be transversely oriented. Also, line 60: The conal fibrosa is not apparent in figure 6E except at the insertion point into the bulbar ridge.

Next page, lines 7-9: Arrangement into "concentric sheets" is not apparent.

Under epigraph 4.1, line 16 of second page: The name of the species should be added after "holocephali" to indicate the singularity of the findings reported in Duran et al., 2015.

Finally, as compared to bulbus, within the wall of the conus arteriosus of *L.osseus* is a well developed system of adrenergic, cholinergic, substance P-positive and nNOS-positive nerve terminals (Zaccone et al. 2011, 2012) that co-innervate the myocardium and the smooth muscle located in the conal subendocardium, suggesting the presence of both extrinsic and intrinsic nerves. A possibility that the gar and bichir (Zaccone et al. 2009a,b) OFT is innervated by both vagal motor neurons and spinal neurons is postulated, but not confirmed by physiology and pharmacology. These studies could also appear or included in body manuscript.

Primera respuesta del revisor 2

General comments

The Ms entitled « Anatomical, histochemical and immunohistochemical characterization of the cardiac outflow tract of the arawana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Teleostei: Osteoglossiformes) » is an interesting contribution to our knowledge of the cardiac outflow tract of actinopterygians. The finding of two (dorsal and ventral) prominent longitudinal ridges at the luminal side of the bulbus serving to anchor the commissures of the conal valves is a landmark discovery not reported to date in any Actinopterygia. This finding, in itself, justifies the publication of this Ms.

The manuscript is well written. I loved to read the detailed and accurate anatomical descriptions distinctive of the research group and particularly of the senior author. I suggest, however, a few corrections that may improve the quality of this contribution. First, the use of expressions like "ancient teleost lineages", abundant throughout the Ms, were frequent

in the context of the synthetic theory of evolution. However, these expressions should be avoided in the context of modern evolutionary biology because it has been shown that the term lineage is vague, it refers often to paraphyletic groups and, more importantly, it can't be tested (so, according to Popper, it does not belong to empirical science). In contrast, clades are precisely defined by synapomorphies after phylogenetic analysis, and can be refuted by other phylogenetic analyses. So please verify that your "lineages" really correspond to monophyletic groups and replace this term by "clades" throughout the Ms. Please replace "phylogenetically advanced" by "derived" The model proposed to explain the function of the bulbus of the arawana is interesting. Authors suggest that "the whole musculature of the bulbus relaxes during the ventricular systole, allowing the bulbus to dilate, thus facilitating blood flow to the ventral aorta. In this process, the thick subepicardial collagen layer may play an important role, avoiding excessive widening of the bulbus. During ventricular diastole, the contraction of the smooth musculature would narrow and shorten the bulbus, participating in the systolic ejection." Although I understand that testing this model is beyond the scope of this Ms, please show what kind of experimental procedures may be necessary to test this model.

Finally, the problem of heart pigmentation is, in my view, one of the most important ones of the Ms. This problem is under-discussed. Please develop this point in the revised version of the Ms.

Jorge Cubo

Respuesta al editor

Dear Prof. Adam P. Summers,

We thank you very much for your attention to our paper describing the cardiac outflow tract of *Osteoglossum bicirrhosum* (ZOOL-D-16-00018).

First and foremost, we would like to clarify why we used the common name "arawana" instead of "arowana" to refer to the species studied. We took this decision because "arawana" is the common name for *Osteoglossum bicirrhosum* which appears in the FishBase (<http://fishbase.mnhn.fr/search.php>). Interestingly, in the list of other common names given by the FishBase, "arawana" is said to be used in USA and Germany, among other countries, while "arowana" is used in Denmark, Germany, Brazil and Sweden. According to the SearchFishBase, however, the Osteoglossidae, as such class, are termed "arowanans" and not "arawanans." Looking for the number of citations of "arawana" versus "arowana", we have found that "arawana" has been used about 131,000 times in the

literature, while “arowana” has been used about 365,000 times. In the Wikipedia, (http://en.wikipedia.org/wiki/Silver_arowana), *Osteoglossum bicirrhosum* is called “silver arowana”, although specifying that the word “arowana” is sometimes spelled “arawana.”

Given these contradictions, we have decided to refer to the present species using the binomial term “silver arowana” thereby distinguishing it from the other “arowanas” (*Osteoglossidae*). In this way, we hope to avoid any confusion.

We have read carefully the comments of the Reviewers, and we appreciate very much the effort they have made to improve our work. In response to this, we have introduced the necessary changes in our manuscript, aiming to address the suggestions of the Reviewers. Our delay in sending you a new revised version has been precisely because we have evaluated thoroughly all issues raised by them. We have even tried unsuccessfully to obtain new material. Therefore we have selected new photographs which we have grouped into four figures, instead of six as we presented in our first version.

We hope that, with the changes as shown in the revised text, our manuscript will be deemed suitable for publication in *Zoology*.

Respuesta al revisor 1

1. According to the Reviewer, a major problem with the manuscript is that the conal insertion of the conal valves is not unequivocally demonstrated. He/she claims that the conal insertion of the leaflets is only seen, and just on one side, in figure 6E (first version). In addition, he/she says that Figures 3 and 4 of the first version show that the valve leaflets arise from the conus-bulbus connective boundary. Following this criterion, the Reviewer also indicates that in Figure 2 (first version), the left leaflet is entirely situated in the bulbus while the situation of the right leaflet in relation to the conus is unclear

We agree with the Reviewer that in some figures, the valve leaflets are seemingly inserted in the conus-bulbus boundary, a fact that would even contradict the embryonic origin of the outflow tract valves from the conal mesenchymal cushions. In fact, the sections referred to by the Reviewer correspond to lateral portions of the leaflets close to their commissures.

To solve this misunderstanding, we have added the Figures 2D and C (new version) which unequivocally show that the proximal, basal portion of the leaflets is fully inserted in the conus arteriosus.

Figure 2C (new version), which was presented is a panoramic view of the heart showing all (six) cardiac segments, two of which, the atrioventricular segment and the

conus arteriosus, cannot be seen externally. Therefore, we have decided to maintain this figure in the new version, albeit admitting that the insertion of the valves to the conus is somewhat ambiguous.

2. As argued by the Reviewer, several descriptions seem to be equally unclear. Under the epigraph 3.2, lines 50-55 (first version), it is stated that the "myocardium of the conus was surrounded by connective tissue", and that "this connective tissue served to anchor the OFT valves". Conal valves are supposed to anchor to the inner side of the conus, not to the connective layer surrounding (encircling, on the external side) the conus myocardium. All the related light microscope images (except figure 6E) show that the leaflets anchor at the conus-bulbus connective boundary.

In this regard, and here again we must say that Figures 2D and C (new version) show that both leaflets are inserted in the conal myocardium. Moreover, we have removed the sentences mentioned by the Reviewer which were certainly wrong

3. Referring to figures 3-4 and figure 6E (first version), the Reviewer wonder whether the OFT valves of the arowana arise from the conus-bulbus boundary and, hence, they are entirely bulbar (Figs. 2-4), or they consist of a double component, the tissue pad (which has not been considered) and the free leaflet (Fig. 6E). He/she say that the former would be an unsuspected evolutionary novelty that may have profound phyletic implications and should merit a more elaborated preparation (including figure 2). Therefore, the Reviewer suggests a SEM preparation depicting a longitudinal section through the midline of the leaflet(s) to show conus, bulbus and leaflets altogether.

We have introduced several changes in the text in order to clarify this issue. There is no tissue pad from which the leaflet arises. Each leaflet has a very thick and cellular body that tapers towards the distal portion, so that the free edge of the leaflet is very thin.

Specifics comments

1. Page numbers are most helpful and should be added.

This has been done in the present revised version.

2. According to the Reviewer, under epigraph 3.1, lines 20-24, color descriptions: red color may be due to blood content, especially in the ventricular chamber.

We have deleted the comment on this issue in the text and have introduced a comment on the color of the ventricle in the legend of Figure 1A (new version).

3. As indicated by the Reviewer referring to lines 3-16 of the following page, (a) the leaflet structure is not evident in Figure 2 (first version), and (b) the geometrical description of the leaflet is overdone: it would be sufficient to state that the leaflets are pocket-like.

We have shortened and simplified the text, though we have kept the description of the main features.

4. The Reviewer indicates that the positive immunoreactivity against the antibody A4.1025 (epigraph 3.2, lines 58-60) in the ventricle and conus appears to be just over background. He/she asks why is the staining more intense in the atrium?

In the panoramic view of the section, the mark is clear when comparing the myocardium with the rest of tissue.

The apparent differences between the labelling of the atrium and the rest of myocardium may be due to the higher content of myosin in the atrium, as pointed out by Franco et al., 2002 (*Anat Rec* 268: 27-37). Another possible reason for the apparent differences may be the effect of the fixative. Whatever it might be, we believe that any of these explanations would be pure speculation and would not contribute to improve the main message of our report.

5a The Reviewer says that the ridges are barely discernable in panels 5B-C (first version). He/she proposes that the small diameter of the ridges in cross-sections should have to be emphasized.

This fact has been mentioned in the results.

5b) According to the Reviewer, at the base of the prominent ridge shown in figure 5E, all the elastin layers appear to be transversely oriented.

We must confess that we do not understand exactly what the Reviewer is asking.

What we describe is that the prominent dorsal and ventral ridges include elastic laminae from both the inner and middle layers. Instead, the longitudinal, smaller ridges only include elastic laminae from the inner layer.

6. The Reviewer considers that the conal fibrosa is not apparent in figure 6E (first version) except at the insertion point into the bulbar ridge.

We have clarified this issue in the revised text.

7. The reviewer considers that the arrangement into "concentric sheets" is not apparent.

We have modified the text to clarify this issue.

8. The reviewer considers that the name of the species examined should be added after "holocephali" to indicate the singularity of the findings reported in Duran et al. (2015).

We have added the name of the holocephali species studied.

9. Finally, the Reviewer comments that as compared to bulbus, within the wall of the conus arteriosus of *L. osseus* there is a well developed system of adrenergic, cholinergic, substance P-positive and nNOS-positive nerve terminals (Zaccone et al. 2011, 2012) that co-innervate the myocardium and the smooth muscle located in the conal subendocardium, suggesting the presence of both extrinsic and intrinsic nerves. A possibility that the gar and bichir (Zaccone et al. 2009a,b) OFT is innervated by both vagal motoneurons and spinal neurons is postulated, but not confirmed by physiology and pharmacology. These studies could also appear or included in body manuscript.

The findings of Zaccone et al. are undoubtedly very interesting. The sole relation that these data might have with our findings seem to be that the nerve terminals found by these authors in *Lepisosteus* might have a neural crest origin as we suggest for the pigment cells observed in the arowana. We are unable to see any other connection between the data of Zaccone et al. and our observations. Moreover, the nerve terminals are located in the subendocardium of *Lepisosteus*, whereas the melanophores of the arowana are placed in the superepicardium. Therefore, we have decided to omit any comment on this issue, which we believe could be too speculative.

In summary, we have recomposed not only the figures, but also the text. Briefly, the main changes affect the results and discussion. We have changed the order of the items. First, we have referred to the conus arteriosus, then to the conal valves, and finally to the bulbus arteriosus. We hope, thereby to have clarified the questions raised by the Reviewer

Respuesta al revisor 2

1. We agree with the Reviewer that in the context of the modern evolutionary biology, the term lineage is vague because it can refer to paraphyletic groups. We also agree that the term clade is precisely defined by synapomorphies. Nonetheless, within teleosts, the monophyletic condition of a number of groups is still uncertain. Therefore, we have changed “lineage” by “clade” where there was enough evidence of monophyly, and have replaced “lineage” by “group”, which is a more neutral term, to refer to those taxa, the monophyly of which remains an open question.

2. The Reviewer suggests replacing “phylogenetically advanced” by “derived” when referring to the conclusions of Schib et al. (2002). Given, however, that the term “phylogenetically advanced” was specifically used by these authors, we have decided to maintain it in the text, but in quotation marks.

3. With regard to our speculation about the possible action of the bulbus arteriosus of the arowana, the Reviewer asks what kind of experimental procedures we could propose to test our hypothesis. As recognized by the Reviewer himself, this is beyond the scope of our study. Moreover, experimental studies on the performance of the bulbus arteriosus are really scarce due to the difficulty to work with live animals. Nonetheless, we have added a sentence indicating that procedures such as those used by Braun et al. (2003a,b) in tunas might provide evidence about the accuracy of our suggestion.

4. The Reviewer considers that the issue referring to the heart pigmentation is of great interest and that we should develop this point in the revised version. In fact, knowledge about the occurrence of pigment cells in fish hearts is extremely scarce. However, following the suggestion of the reviewer, we have tried to highlight the issue, rewriting the whole paragraph 4.4 of the Discussion, where we now expose briefly the possible immune role of the pigment cells occurring in the fish heart.