



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

JUANN ARYELL FRANCISCO DE HOLANDA ABREU

**ANATOMIA E FUNÇÃO DA MUSCULATURA MASTIGATÓRIA DE MARSUPIAIS
DIDELFÍDEOS (DIDELPHIMORPHIA; DIDELPHIDAE)**

Recife
2023

JUANN ARYELL FRANCISCO DE HOLANDA ABREU

**ANATOMIA E FUNÇÃO DA MUSCULATURA MASTIGATÓRIA DE MARSUPIAIS
DIDELFÍDEOS (DIDELPHIMORPHIA; DIDELPHIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biologia Animal.

Orientador: Diego Astúa de Moraes

Recife
2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Abreu, Juann Aryell Francisco de Holanda.

Anatomia e função da musculatura mastigatória marsupiais didelphídeos (didelphimorphia; didelphidae). / Juann Aryell Francisco de Holanda Abreu – 2023.

125 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Diego Astúa de Moraes.

.

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e apêndice.

1. Didelphidae. 2. Anatomia muscular. 3. Músculos mastigatórios. 4. Massa muscular. 5. Comprimento dos fascículos. 6. PCSA. 7. Força de mordida. 8. Dieta. I. Moraes, Diego Astúa (Orient.). II. Título.

590

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-018

JUANN ARYELL FRANCISCO DE HOLANDA ABREU

**ANATOMIA E FUNÇÃO DA MUSCULATURA MASTIGATÓRIA DE MARSUPIAIS
DIDELFÍDEOS (DIDELPHIMORPHIA; DIDELPHIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biologia Animal.

Aprovado em: 28/11/2023

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Bruna Martins Bezerra (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^a. Rafaela Velloso Missagia (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Dr. Leonardo Guimarães Lessa (Examinador Externo)
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio, em especial a minha mãe, Patrícia Ferreira, que fez tudo para que eu tivesse acesso às melhores oportunidades, e minha irmã, Yohanna Francisca, que sempre me ajudou em casa nos momentos mais atribulados de entrega de trabalhos ou relatórios durante o mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de Mastozoologia, principalmente as que entraram comigo: Milena, Winne e Lilian, em que compartilhamos os mais variados aprendizados; e Francisco, que sempre me confortou nos meus momentos pessimistas do mestrado. Também agradeço a Patricia por todo o ensinamento e apoio, além de ser um grande exemplo de pesquisadora que me mostrou o quanto esse lugar deve ser aproveitado e não temido.

Aos meus amigos da vida: Dinara, Anna, Juliana, Túlio e Flávia, que levo comigo desde a graduação. Em particular, agradeço a Túlio e Flávia, que também participaram do meu “comitê particular de crise” junto com Milena e Francisco, e fizeram os dois anos ainda mais especial por todos os momentos que compartilhamos dúvidas, confusões, e expectativas pro futuro.

Ao meu orientador, Diego Astúa, que me forneceu essa oportunidade. Agradeço por toda confiança, paciência e apoio, e por me proporcionar aprendizados a cada momento.

Aos membros da banca: Dr^a. Rafaela Missagia, Dr. Leonardo Lessa e Dr^a. Bruna Bezerra, por todas as considerações, críticas e elogios, que foram de grande importância para o aperfeiçoamento desta dissertação, e meu como pesquisador.

Ao PPGBA e CNPq pela concessão da bolsa. À *American Society of Mammalogists* (ASM) pelo auxílio do prêmio *Black and Indigenous Scholars in Mammalogy Award* que será de grande valia para os novos projetos que estão por vir.

RESUMO

Os didelfídeos representam a maioria da diversidade dos marsupiais americanos. Tradicionalmente, são considerados como generalistas, mas variam quanto a proporção dos itens que consomem. Nós abordamos a relação entre as características musculares e a exploração dos recursos alimentares a partir de dois estudos, ao longo da ontogenia de *Didelphis albiventris* e diferentes gêneros de didelfídeos. Para isso, nós apresentamos dados anatômicos (fixações musculares no crânio e mandíbula, e orientações das fibras) e relações biomecânicas da musculatura mastigatória de uma série ontogenética de *D. albiventris* (21 espécimes) e nove gêneros de Didelphidae (16 espécimes, incluindo *Caluromys*, *Didelphis*, *Lutreolina*, *Philander*, *Metachirus*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Monodelphis* e, parcialmente, *Chironectes*). No segundo estudo, os músculos foram digeridos quimicamente após a dissecação para análise da arquitetura muscular, com a medição do comprimento dos fascículos e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA). Nós combinamos essas informações para estimativas funcionais relacionadas a dieta, como a força de mordida. A ontogenia da anatomia dos músculos mastigatórios de *D. albiventris* apontou um aumento das áreas de fixação desses músculos no crânio e mandíbula, e da adução mandibular ao longo do desenvolvimento. Os músculos cresceram essencialmente com alometria positiva. Essa tendência indica que indivíduos adultos possuem músculos relativamente maiores e provavelmente uma mordida mais forte para o consumo de itens mais difíceis na idade adulta. No entanto, através de amostra dos didelfídeos, a massa e as propriedades arquiteturais de comprimento dos fascículos e PCSA, foram isométricos. As forças de mordida calculadas no canino e primeiro molar também não foram diferentes da isometria e não correlacionaram com a dieta, embora as principais diferenças na anatomia dos músculos adutores da mandíbula tenham sido identificadas entre os gêneros mais carnívoros e frugívoro da amostra. Portanto, a variação na força de mordida dos didelfídeos foi absoluta, e a diversificação da dieta pode ser suportada pela diferenciação do tamanho.

Palavras-chave: Didelphidae; Anatomia muscular; Músculos mastigatórios; Massa muscular; Comprimento dos fascículos; PCSA; Força de mordida; Dieta.

ABSTRACT

Didelphids represent the majority of the diversity of American marsupials. Traditionally, they are considered to be generalists, but they vary in terms of the proportion of items they consume. We approached the relationship between muscular characteristics and the exploitation of food resources from two studies, throughout the ontogeny of *Didelphis albiventris* and different genera of didelphids. To this end, we present anatomical data (muscle attachments to the skull and mandible, and fiber orientations) and biomechanical relationships of the masticatory muscles of an ontogenetic series of *D. albiventris* (21 specimens) and nine genera of Didelphidae (16 specimens, including *Caluromys*, *Didelphis*, *Lutreolina*, *Philander*, *Metachirus*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Monodelphis* and, partially, *Chironectes*). In the second study, the muscles were chemically digested after dissection to analyze the muscle architecture, measuring the length of the fascicles and calculating the physiological cross-sectional area (PCSA). We combined this information for diet-related functional estimates, such as bite force. The ontogeny of the anatomy of the masticatory muscles of *D. albiventris* showed an increase in the areas of attachment of these muscles in the skull and mandible, and mandibular adduction throughout development. The muscles grew essentially with positive allometry. This trend indicates that adult individuals have relatively larger muscles and probably a stronger bite for consuming more difficult items in adulthood. However, by sampling didelphids, the mass and architectural properties of fascicle length and PCSA were isometric. The bite forces calculated on the canine and first molar also did not differ from isometry and did not correlate with diet, although the main differences in the anatomy of the jaw adductor muscles were identified between the most carnivorous and frugivorous genera in the sample. Therefore, the variation in bite force of didelphids was absolute, and diet diversification can be supported by size differentiation.

Keywords: Didelphidae; Muscular anatomy; Masticatory muscles; Muscle mass; Fascicle length; PCSA; Bite force; Diet.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. CAPÍTULO 1. Técnicas para o estudo da musculatura em pequenos mamíferos: dissecação clássica e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA).....	11
2.1. Introdução.....	11
2.2. Dissecação.....	17
2.3. Obtenção do comprimento dos fascículos.....	19
2.4. Estimativa da PCSA.....	23
2.5. Outros fatores de correção.....	26
2.6. Perspectivas.....	28
3. CAPÍTULO 2. Ontogenia pós-natal dos músculos mastigatórios de <i>Didelphis albiventris</i> (Lund, 1840) (<i>Didelphimorphia</i>, <i>Didelphidae</i>).....	36
3.1. Introdução.....	36
3.2. Material e Métodos.....	41
3.2.1. Amostra.....	41
3.2.2. Dissecação.....	41
3.2.3. Modelo biomecânico.....	42
3.2.4. Análise de dados.....	43
3.3. Resultados.....	44
3.3.1. Descrição anatômica.....	44
3.3.2. Fração das massas musculares.....	50
3.3.3. Regressões.....	52
3.4. Discussão.....	54
3.5. Conclusão.....	61
3.6. Tabelas.....	62
4. CAPÍTULO 3. Arquitetura Muscular Mastigatória e Implicações para a Dieta de Marsupiais Didelfídeos (<i>Didelphimorphia</i>; <i>Didelphidae</i>).....	65
4.1. Introdução.....	65
4.2. Metodologia.....	68
4.3. Resultados.....	75
4.3.1 Descrição anatômica.....	75
4.3.2. Fração das massas musculares.....	79
4.3.3. Escalonamento das propriedades musculares e forças de mordida.....	81
4.3.4. Vantagem mecânica e Fator de extensão.....	83
4.3.5. Força de mordida e dieta.....	85
4.4. Discussão.....	86
4.5. Conclusão.....	90
4.6. Tabelas.....	91
5. CONCLUSÃO GERAL.....	94
6. REFERÊNCIAS.....	95

7. APÊNDICE.....	109
-------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO GERAL

A morfologia do sistema mastigatório de mamíferos está envolvida em diversas funções, desde a retenção e mastigação do alimento à vocalização, respiração e comportamento agonístico (HERRING; HERRING, 1974). Mesmo havendo funções que podem ser conflitantes entre si, a variação do aparelho mastigatório entre táxons é influenciada principalmente pelos hábitos alimentares, o que explica a correlação observada do aparelho mastigatório com a ecologia alimentar. Diferentes tipos de dieta refletem modificações morfológicas e funcionais (SHI et al., 2020) que combinam informações de anatomia, mecânica e comportamento (HERRING, 1993).

O tamanho, a anatomia e o arranjo interno dos músculos são determinantes fundamentais da capacidade funcional do sistema mastigatório (HARTSTONE-ROSE et al., 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019). Esses dados podem ser utilizados para estimar fatores críticos de desempenho (e.g. exploração do recurso alimentar), como a abertura de boca, relacionada com a capacidade de estiramento muscular, e a força de mordida, proporcional a área de secção transversal fisiológica (PCSA) dos músculos (ABREU; GUILHON; ASTÚA, 2023). A força de mordida é um dos aspectos mais estudados pois representa um fator importante relacionado à amplitude do nicho potencial, capaz de refletir a intensidade de desafios ecológicos em relação ao alimento (ANDERSON; MCBRAYER; HERREL, 2008; SHI et al., 2020). Com isso, modelos de estimativa têm sido amplamente utilizados em estudos comparativos, baseados em aproximações fornecidas pela associação da morfologia craniomandibular com a arquitetura muscular (HERREL et al., 2008; HERREL; AERTS; DE VREE, 1998). Diversos estudos que incluem informações musculares relacionadas à força de mordida têm sido empregados em estudos com diferentes grupos de mamíferos (de morcegos à ursídeos; HARTSTONE-ROSE et al., 2022; SANTANA; DUMONT; DAVIS, 2010), mas são ainda escassos para os marsupiais. Mesmo os didelfídeos representando a vasta maioria dos marsupiais americanos (127 das 137 espécies do Novo Mundo, em 18 gêneros; ASTÚA; CHEREM; TETA, 2022), até o presente momento, nenhum estudo amplo investigou a variação morfológica nos músculos mastigatórios em Didelphidae com relação à dieta.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar o aparato mastigatório de didelfídeos quanto aos padrões de variação no tamanho, arquitetura muscular, e relacionamentos biomecânicos que sugerem sua relação com a exploração dos recursos alimentares. No primeiro capítulo, revisamos as técnicas usadas na medição das variáveis arquiteturais, incluindo o comprimento médio dos fascículos e PCSA dos músculos, aliada a dissecação clássica. Essas abordagens foram utilizadas no segundo e terceiro capítulos, que descrevem a musculatura mastigatória ao longo de uma série ontogenética de *Didelphis albiventris*, e em diferentes gêneros de didelfídeos, que incluíram espécies mais frugívoras, insetívoras e carnívoras, da família Didelphidae.

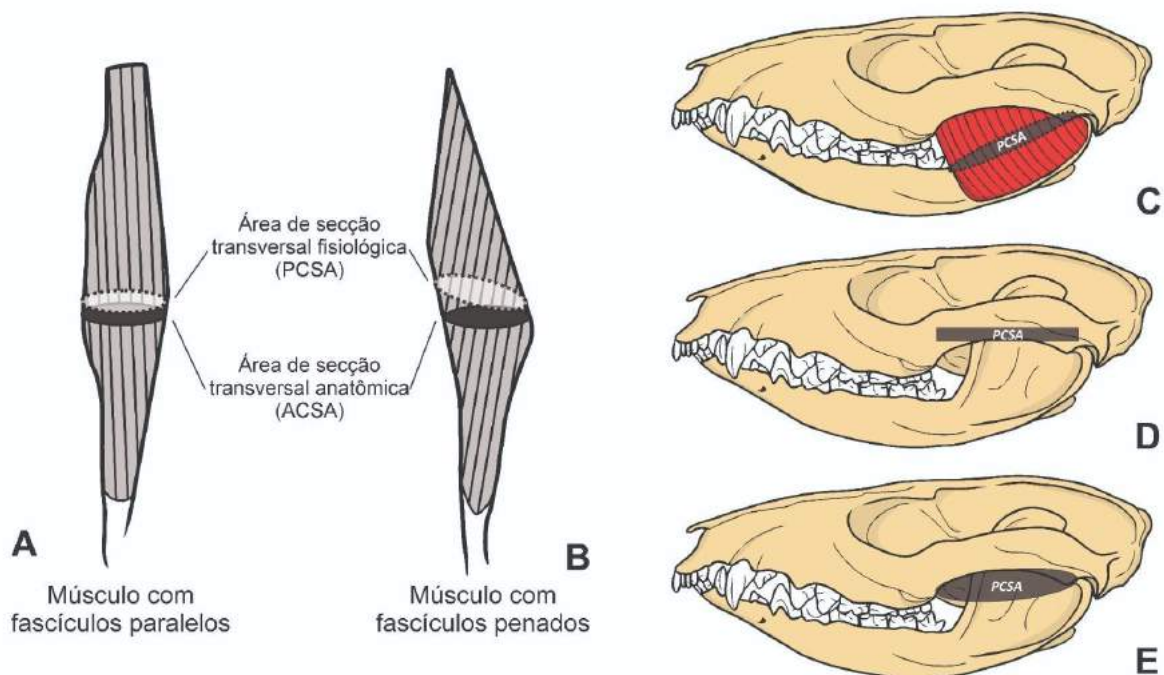
2. CAPÍTULO 1. Técnicas para o estudo da musculatura em pequenos mamíferos: dissecação clássica e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA)

2.1. Introdução

O estudo das relações entre a forma dos organismos e sua função é antigo, e tem sido uma das bases da biologia evolutiva nas últimas décadas (BELS; HERREL, 2019; RAYFIELD, 2019; SANTANA; DUMONT; DAVIS, 2010; SILVA et al., 2016). Ecomorfologistas e morfologistas funcionais se interessam por essas associações (AERTS et al., 2002; DIOGO, 2017), principalmente quando aplicadas às estruturas que conferem o desempenho de tarefas ecológicas importantes como comer ou se locomover. Exemplos disso são os esforços para identificar a relação entre a morfologia do aparato alimentar e dieta (MISSAGIA et al., 2021; SMITH; REDFORD, 1990) ou da morfologia dos membros com o modo locomotor (MARCHI et al., 2018; TAVERNE et al., 2018), relacionadas a funções como morder e andar, respectivamente. No entanto, o que o animal faz (*i.e.*, comportamento) ou o quanto ele pode fazer (*i.e.*, desempenho), é limitado pela morfologia (GARLAND; LOSOS, 1994; RAYFIELD, 2019). Essa relação entre a variação morfológica e traços relevantes de desempenho é habitualmente investigada pela morfometria, conforme dimensões ósseas são assumidas como preditoras funcionais para a morfologia musculoesquelética. Contudo, as capacidades funcionais dos músculos podem ser melhor compreendidas com a anatomia e estrutura interna (LEONARD et al., 2022b). As áreas de fixação, tamanho, arranjo e até a composição do tipo das fibras musculares são determinantes fundamentais, já que correspondem potencialmente a fatores críticos de desempenho (HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; RAVOSA et al., 2010).

Figura 1. Representação de músculos com fascículos paralelos (A) e penados (B), e das áreas de secção transversal fisiológica (PCSA) e anatômica (ACSA) em cada músculo; e aproximações da PCSA (área sombreada) do *m. masseter* de *Didelphis albiventris* (C) usando medições osteológicas no crânio (D-E). A e B: a ACSA é medida perpendicular ao eixo longitudinal do músculo e é igual a PCSA em A, mas não considera a mudança na orientação dos fascículos em B, diferente da PCSA. Os fascículos mais curtos estão em maior quantidade em B e resultam numa PCSA maior. C-E: um método simples usado por Kiltie (1982, 1984) calcula a área de um retângulo que abrange comprimento e largura da origem do músculo no crânio (D). O método de Thomason (1991) ou de crânio seco (*dry skull*) usa a área preenchida pelo músculo no crânio. A área do *m. masseter* é

combinada com a do *m. pterygoideus medialis* e medida na visão ventral, aqui ilustrada na visão lateral (E). Maiores detalhes podem ser obtidos nas descrições originais.

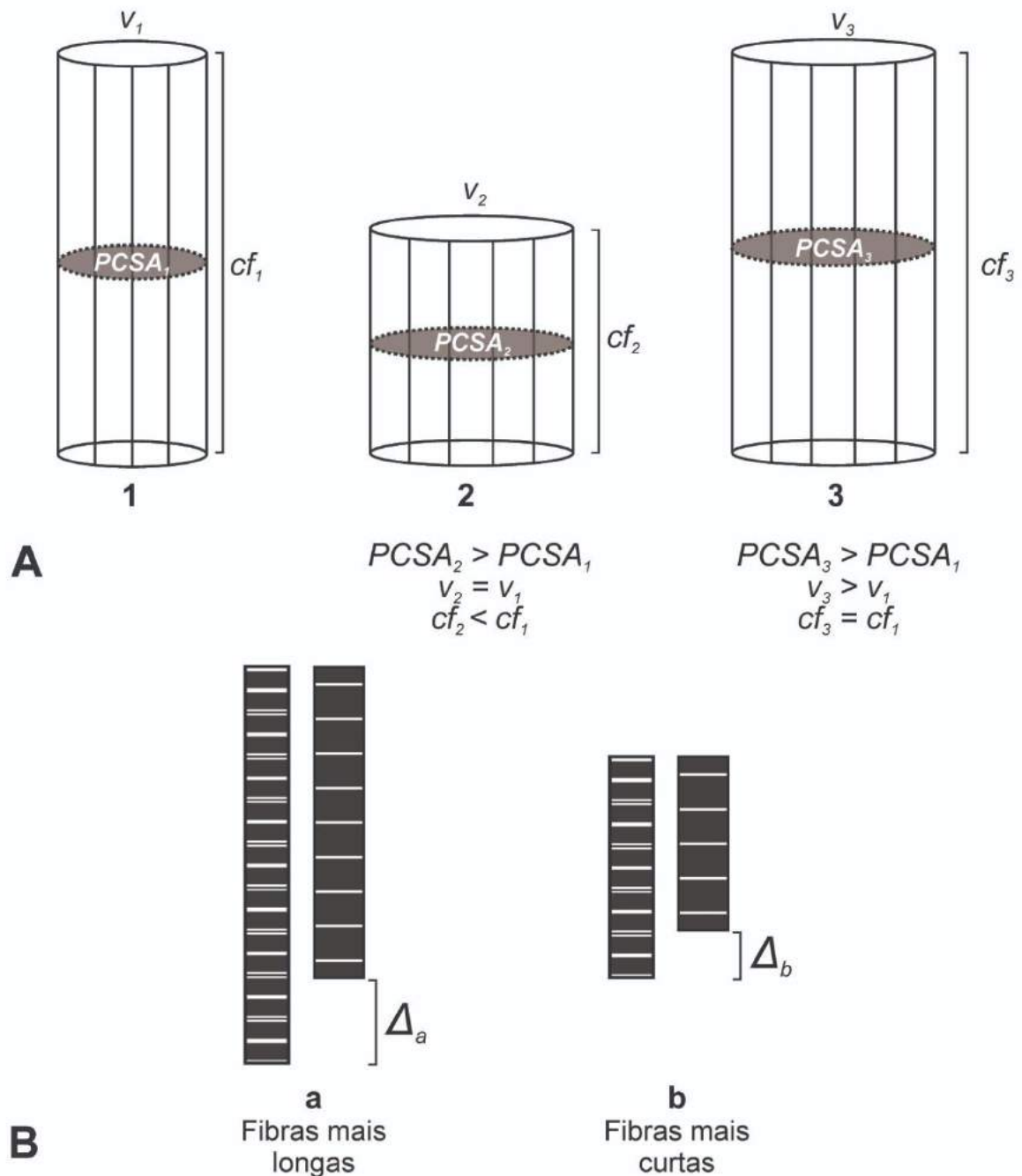


Fonte: O autor (2023)

A relação funcional de aspectos da musculatura, como a variação da massa relativa de músculos individuais, dos locais de fixação, ou estrutura interna, vem sendo abordada com algum detalhe desde a metade do século passado (DAVIS, 1955, 1964; HERRING, 1972; HERRING; HERRING, 1974; KILTIE, 1982; 1984; TURNBULL, 1970). Antes da notável (ou heróica; HERRING, 1993) revisão de Turnbull (1970) do aparato mastigatório de mamíferos, Davis (1955, 1964) os utiliza na comparação da musculatura mastigatória de carnívoros e aborda as diferenças na secção transversal das fibras musculares (atual área de secção transversal fisiológica) na extensão da força muscular. Essa área de secção transversal fisiológica (do inglês *physiological cross-sectional area*, ou PCSA) de um músculo se refere ao somatório das secções transversais das fibras musculares individuais (MARCHI et al., 2018; VINYARD; TAYLOR, 2010). A PCSA é diferente da área de secção transversal anatômica, que é medida perpendicular ao eixo longitudinal do músculo e não considera a orientação das fibras (Figura 1A-B) (LEISCHNER et al., 2018; MARCHI et al., 2018). A PCSA representa uma métrica proporcional à produção de força muscular isométrica máxima pois reflete o maior número de fibras que exerceriam tensão por unidade de volume muscular (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; LEONARD et al., 2021, 2022a; MARTIN et al., 2019,

2020). Em resumo, quanto maior a PCSA, mais fibras estariam contidas no músculo e, conseqüentemente, a capacidade de produção de força muscular é maior. Diversos estudos vêm utilizando essa propriedade muscular para inferências morfofuncionais em mamíferos: abordagens com músculos mastigatórios tem investigado a relação com a capacidade de animais consumirem alimentos mecanicamente resistentes (HARTSTONE-ROSE et al., 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012) ou quanto a morfologia dos músculos dos membros descreve a interação com o substrato (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; MARCHI et al., 2018; MARTIN et al., 2019).

Figura 2. Representação de como o volume e comprimento dos fascículos podem modificar características do músculo (representado pelo cilindro), como a PCSA e a velocidade de contração. A: A PCSA (área sombreada) aumenta com o menor comprimento dos fascículos (situação 2) ou maior volume do músculo (situação 3). B: Fibras mais longas (a) se estendem e contraem mais do que fibras mais curtas (b) ($\Delta a > \Delta b$) ao mesmo tempo, ou seja, são mais rápidas.



Fonte: O autor (2023)

É muito difícil realizar a medição direta da PCSA em todos os músculos. Tentativas de estimar a PCSA da estrutura óssea foram aplicadas em especial no aparato mastigatório (Figura 1C-E) e embora possa ser relativamente bem estimada para os músculos mastigatórios pelo método de Thomason (DICKINSON et al., 2021; PENROSE et al., 2020; THOMASON, 1991), outras informações musculares influenciam a variação do desempenho. Tanto o tamanho do músculo quanto das fibras musculares são importantes, já que a magnitude da força que um músculo

pode produzir depende da quantidade de fibras dentro dele (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023). Músculos maiores tendem a conter um maior número de fibras, ao mesmo tempo em que fibras menores estão em maior número em um mesmo volume muscular (Figura 2A). A relação da PCSA com o volume muscular e com o comprimento de fibra é expressa como:

$$PCSA = \frac{v}{cf} \text{ ou } \frac{m}{\rho \times cf}$$

onde v é o volume muscular (cm^3), cf é o comprimento médio da fibra muscular (cm), m é a massa do músculo (g), e ρ é a densidade do músculo ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$); PCSA em cm^2 . Como as fibras não ocorrem de maneira individualizada dentro dos músculos (*i.e.*, agrupadas em fascículos que, subsequentemente, formam os ventres musculares), seu comprimento é usualmente medido através dos fascículos, como cf será referido daqui para frente

Os músculos que possuem algum tipo de penação (unipenados, bipenados ou multipenados) apresentam fascículos que se inserem a um ângulo nos tendões (ANAPOL; BARRY, 1996). Os fascículos têm seu comprimento reduzido nesses músculos e, com isso, a PCSA é aprimorada (Figura 1A-B). Já os fascículos paralelos são geralmente mais longos e relacionados ao quanto o músculo pode se estender e a velocidade de sua contração (LEISCHNER et al., 2018; LEONARD et al., 2022a). Os sarcômeros (as menores unidades funcionais da contração muscular) estruturados serialmente e em maior quantidade nos fascículos longos, possibilitam uma excursão muscular relativamente maior e uma contração muscular mais rápida quando comparado com músculos de dimensões equivalentes (Figura 2B) (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; LEONARD et al., 2022b; MARCHI et al., 2018; MARTIN et al., 2019, 2020; TAVERNE et al., 2018). Contudo, alongar as fibras implica em uma PCSA menor. Essa troca funcional descrita pela arquitetura de fibra ou muscular (ANAPOL; BARRY, 1996; DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; PERRY; PRUFROCK, 2018; VINYARD; TAYLOR, 2010) altera a capacidade do músculo de produção de força, extensão e velocidade de contração. Estudos de morfologia funcional miológica de diversos grupos têm contrastado a importância desta variação (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; LEISCHNER et al., 2018).

A determinação da massa, comprimento dos fascículos musculares e da penação dependem da dissecação de espécimes, realizada de maneira física (na sua forma clássica) ou digital. A dissecação digital é feita através do escaneamento do

espécime (ou da parte corpórea de interesse) por meio da tomografia computadorizada (*CT scan*, do inglês *Computed Tomography scan*). É usado um agente de coloração (solução de iodo) para dar contraste ao músculo e permitir sua visualização após o escaneamento e reconstrução digital tridimensional do espécime. O uso da tomografia computadorizada com contraste à base de iodo difusível, ou simplesmente *DiceCT* (do inglês *Diffusible iodine-based contrast-enhanced Computed Tomography*), têm se tornado cada vez mais comum no estudo da anatomia muscular dos mamíferos (DICKINSON et al., 2019; DICKINSON; STARK; KUPCZIK, 2018; HARTSTONE-ROSE; DICKINSON, 2022; SANTANA, 2018). Essa técnica permite a observação anatômica *in situ* dos músculos e a quantificação de parâmetros musculares sem que ocorra a destruição dos músculos, como eventualmente acontece com a dissecação manual (DICKINSON; STARK; KUPCZIK, 2018). No entanto, a dissecação digital não está acessível a todos os pesquisadores. A tomografia requer um maquinário específico e altamente custoso para adquirir e realizar manutenções casuais, além do treinamento de profissionais qualificados para seu uso (FORD et al., 2023; MARTIN et al., 2020). O uso se torna ainda mais dispendioso, e talvez inviável, dependendo do tamanho do espécime e do tomógrafo disponível (BÖHMER et al., 2020; MARTIN et al., 2020).

Por outro lado, as dissecações anatômicas clássicas ou físicas apresentam um custo menor, fornecem dados qualitativos e quantitativos de qualidade (BÖHMER et al., 2020; DE SOUZA JUNIOR et al., 2018), e possuem resultados taxonomicamente amplos acumulados de séculos na literatura para a análise comparativa (apesar de, evidentemente, incorrerem na destruição parcial do espécime). Estudos com os músculos mastigatórios e dos membros locomotores são mais frequentes e têm demonstrado a diversidade da anatomia muscular e suas relações funcionais dentro dos mamíferos, embora permaneçam subexplorados em diversos táxons. Mesmo que muitos grupos de mamíferos ou músculos (e.g., musculatura axial) ainda não tenham sido adequadamente estudados, há uma grande dificuldade no estudo muscular em obter amostras diversas e adequadas (DE SOUZA JUNIOR et al., 2018). O acesso a espécimes apropriados representa muitas vezes uma oportunidade única (MORALES et al., 2018) e deve ser aproveitada para coletar o quanto de informação possível. Com isso e a possibilidade de amostragens amplas em coleções e museus científicos, este ensaio reúne técnicas existentes na literatura

aliadas à dissecação muscular clássica para medição dos fascículos musculares e estimativa da PCSA.

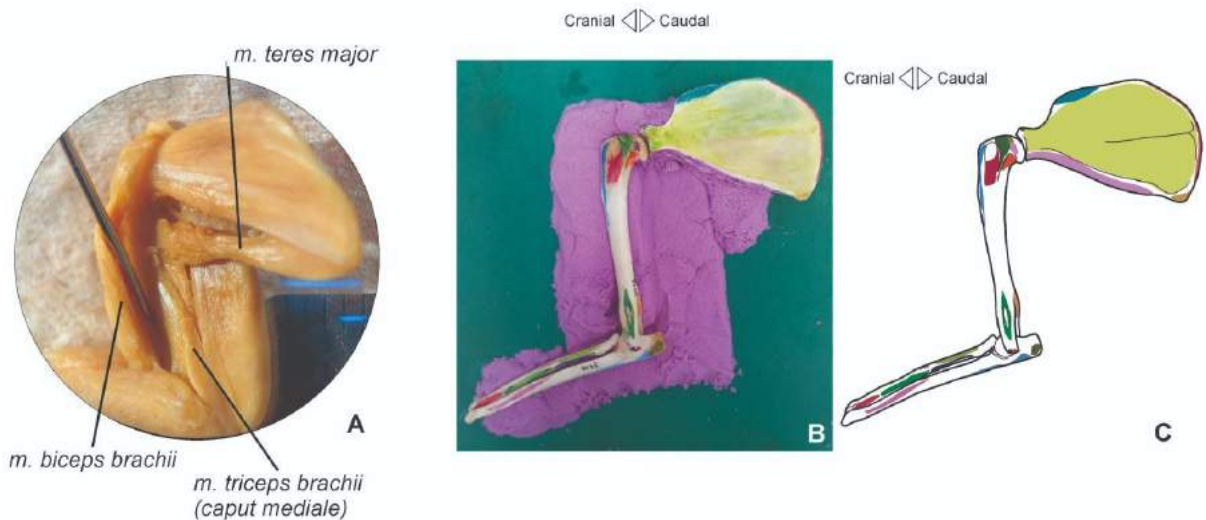
Os métodos podem ser divididos nas seguintes etapas: 1. dissecação; 2. obtenção do comprimento dos fascículos e; 3. estimativa da PCSA.

2.2. Dissecação

A dissecação é um procedimento considerado comum no estudo de mamíferos pela constante necessidade de taxidermizar os espécimes, seja de forma seriada para acondicionamento em coleção, ou de forma expositiva para as galerias de museu. Apesar disso, a carcaça muscular é usualmente inutilizada ao colocar os espécimes para limpeza do esqueleto em dermestério. Incentivamos aqui o retorno dos estudos anatômicos clássicos que não só permitiria ampliar o conhecimento miológico de diversos mamíferos, como também evitaria a perda deste material quando os espécimes são depositados na coleção de forma seca.

Os equipamentos são familiares à taxidermia: cabos de bisturi de número 3 e 4 para o uso de lâminas grandes e pequenas, e pinças, em especial de ponta regular arredondada e ponta fina; outras como ponta dente de rato e ponta romba podem ser úteis para partes mais resistentes. A depender do tamanho do espécime, alfinetes ou agulhas de diferentes calibres podem ajudar na separação e exposição dos músculos (Figura 3A). Ter soro fisiológico à disposição também é útil para manter os espécimes hidratados durante a dissecação, principalmente os que estavam preservados em álcool.

Figura 3. Dissecação do membro torácico do marsupial *Lestoros inca* através de um estereomicroscópio (A) e parte do esqueleto do membro torácico do gato mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) com as inserções musculares pintadas com lápis-de-cor aquarelável (B) e ilustradas (C), todos em visão medial. Em A, podemos reconhecer as regiões escapular, do ombro, do braço e parte do antebraço, encobertos por músculos do membro torácico. Neste caso, os músculos extrínsecos do braço já foram removidos, e inicia-se a separação e identificação dos músculos intrínsecos do braço. A agulha à esquerda separa o *m. biceps brachii*, permitindo também uma melhor visualização dos detalhes da inserção *m. teres major* e do *m. triceps brachii caput mediale*. A: Foto de Gabby Guilhon, espécime FMNH 172050. B e C: Foto e estudo conduzido por Ashtari Piancatelli, espécime UFMG 3938.



Fonte: O autor (2023)

A dissecção de espécimes frescos ou depositados no álcool tem suas vantagens e desvantagens. No caso de espécimes frescos, os músculos estarão menos rígidos, possivelmente com aspecto gelatinoso, o que pode facilitar o manuseio e evitar o rompimento acidental dos ventres e fascículos musculares, embora deixe a visualização dos limites musculares mais difícil para o olho menos treinado. Já o material preservado por um tempo no álcool (etanol 70%), como comumente ocorre nas coleções mastozoológicas, já estará desidratado e ressecará rapidamente durante a dissecção, necessitando de mais hidratação com soro fisiológico do que o espécime fresco. O excesso de ressecamento torna o material frágil e os fascículos musculares podem se quebrar com facilidade. Apesar disso, o ressecamento tem a vantagem de delimitar e evidenciar os limites musculares, os tendões, as fáscias e o tecido conjuntivo de forma mais óbvia do que no material fresco.

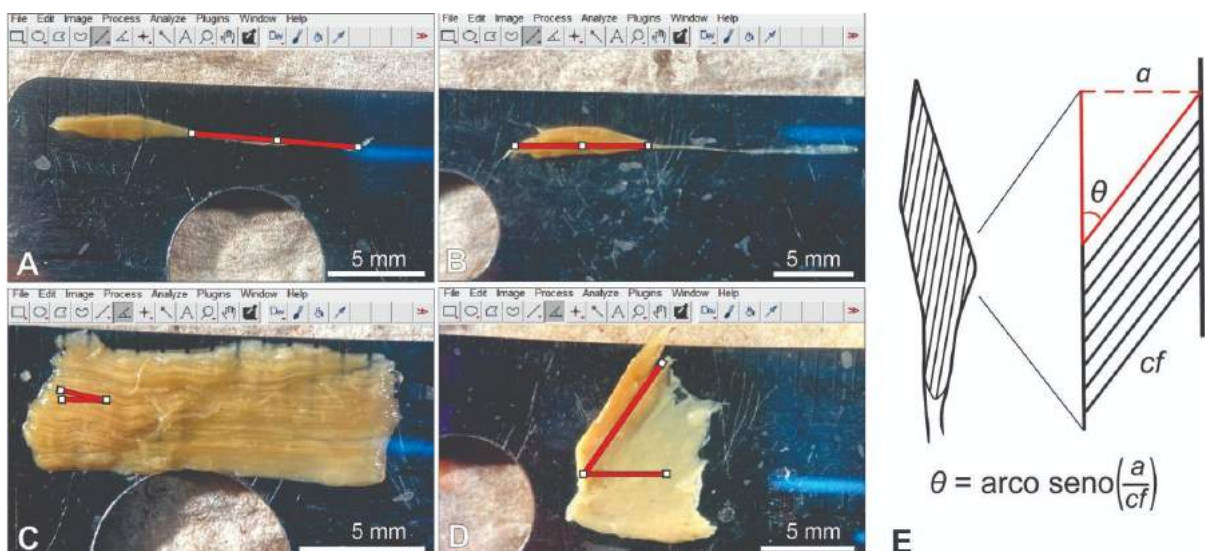
Na remoção da pele da região de interesse, caso o espécime não tenha sido taxidermizado previamente (guias sugeridos: AURICCHIO; SALOMÃO, 2002; DE IULIIS; PULERÀ, 2019), não é recomendado o bisturi pois pode danificar os músculos facilmente. Também é necessária uma atenção especial aos músculos que são aderidos na pele, tanto na cabeça quanto nos membros. Se preciso, use pinças para segurar o tecido conjuntivo e retirá-lo cuidadosamente para expor completamente os músculos desejados.

Durante a dissecção, notas detalhadas sobre as características da inserção e a localização dos músculos, somadas a fotografias tomadas em cada etapa do procedimento e em diversos planos anatômicos, são úteis mais à frente para

identificação e descrição da anatomia muscular. Em especial, as inserções dos músculos nos ossos, tanto a origem quanto a inserção, são variações morfológicas que mudam sutilmente entre espécies e geralmente estão associadas a aspectos cinemáticos e biomecânicos de um comportamento. O uso de referências anatômicas deve auxiliar na delimitação das inserções. Uma metodologia muito eficiente e que não causa danos permanentes ao material ósseo é, logo após a remoção do músculo, pintar as inserções musculares com lápis-de-cor aquareláveis (Figura 3B). Além de facilitar a posterior identificação das inserções musculares, as marcações podem ser facilmente removidas do osso com água (A. Piancastelli, com. pess.). Também podemos envolver o osso, ou fotografias de visões diferentes do osso, com papel filme e fazer as marcações por cima (FISHER et al., 2008).

Reter informações visuais sobre as inserções musculares é essencial para a criação da imagem de mapeamento dos músculos nos ossos (Figura 3C). A presença da régua na foto é indispensável para a produção da escala e também possibilita a medição correta do comprimento do ventre muscular, do fascículo muscular e do tendão (Figura 4A-B), quando possível, independentemente do *zoom* utilizado em cada foto.

Figura 4. A-D: Medições de características musculares no *software* ImageJ: comprimento do tendão muscular (A); fascículos medidos diretamente no ventre muscular (B); e o ângulo de penação que leva em consideração a linha de ação do músculo em fascículos paralelos (C) e penados (D). Fotos de Gabby Guilhon. E: Variáveis usadas na estimativa do ângulo de penação (θ), onde a é a distância perpendicular da linha de ação (ou tendão) à extremidade da fibra no ventre muscular; cf , o comprimento do fascículo.



Fonte: O autor (2023)

2.3. Obtenção do comprimento dos fascículos

A fibra muscular pode ser medida diretamente no músculo (OISHI et al., 2008; PENROSE et al., 2020). Inicialmente, o comprimento do músculo foi utilizado como uma medida ao menos sugestiva para o comprimento da fibra, mesmo que nem sempre seja verdade (HERRING, 1972; MARTIN et al., 2020). Essas medições supõem uma fibra central dentro do músculo que percorre todo comprimento muscular, tirada entre o ponto médio da origem e inserção. Entretanto, quando medidas representativas do comprimento muscular foram usadas com músculos mastigatórios (LANGENBACH; WEIJS, 1990; PERRY; ST CLAIR; HARTSTONE-ROSE, 2015), não mostraram ser bem explicativas – o arranjo interno dos fascículos no músculo influencia o comprimento. A variação do tamanho dos fascículos também pode gerar confusão. Fascículos superficiais são evitados (KIKUCHI; KURAOKA, 2014; MARTIN et al., 2019) pois tendem a ter comprimentos distintos que sozinhos impediriam que toda a diversidade de comprimentos de fibra seja capturada. É necessário garantir que todas as regiões do músculo estejam representadas. Alguns estudos contornam isso realizando secções ao longo do comprimento do músculo ou orientação dos fascículos para medi-los nas diferentes partes (CROOK et al., 2008; VINYARD; TAYLOR, 2010). Fazer incisões para medição dos fascículos é um dos métodos recomendados por Martin et al. (2020). Contudo, dependendo do corte e arquitetura de fibra (*i.e.*, músculos penados), há o risco das fibras expostas não estarem intactas, o que resultaria em medições bem mais curtas que a realidade. Mesmo que Taylor e Vinyard (2020) apontem que não há suporte empírico para isso, seria difícil aplicá-lo em músculos pequenos (MARTIN et al., 2020).

O uso da digestão química para a separação dos fascículos é mais recomendado para espécimes pequenos, e tem sido mais comumente utilizado na literatura. Nesse método, os músculos são submersos em soluções aquosas de ácido até a desintegração do tecido conectivo (MARTIN et al., 2020). Dois ácidos são comumente usados: o ácido nítrico (entre 10-35%) e o ácido sulfúrico (entre 10-20%). O ácido acético (vinagre branco) também parece fornecer resultados equivalentes segundo Leischner et al. (2018). Antes de submergir os músculos no ácido, é necessário remover o excesso de gordura, quando presente, além de tendões externos substanciais (LEONARD et al., 2022a; DE SOUZA JUNIOR et al., 2018). Os tendões são cortados no nível a qual os fascículos fixam sobre ele

(LEISCHNER et al., 2018; MARCHI et al., 2018). Essa prática não é necessária em músculos que possuem inserções carnosas, como acontece com os músculos mastigatórios (LEONARD et al., 2022a). Quando colocados no ácido, o procedimento difere levemente entre o ácido nítrico e o sulfúrico, já que os músculos no ácido sulfúrico são frequentemente aquecidos (cozinhados) entre 60-70°C, embora não seja obrigatório (HARTSTONE-ROSE et al., 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012; LEISCHNER et al., 2018; MARCHI et al., 2018; RAYNE; CRAWFORD, 1972; DE SOUZA JUNIOR et al., 2018). Em todos, o tempo no ácido deve ser monitorado integralmente. Os músculos podem mudar de forma e o nível do ácido terá que ser reajustado se necessário (MARCHI et al., 2018). Depois, os músculos são mantidos até que os fascículos sejam facilmente separados, que na desatenção mínima, pode levar a uma digestão excessiva do ácido e a desintegração das fibras. O tempo de digestão varia quanto à concentração do ácido, características do músculo (tamanho, espessura, área de superfície, quantidade de tecido conectivo) e preservação (se retirados frescos ou desidratados de espécimes fixados com formol e/ou depositados em álcool). A influência das características musculares foi verificada em observações próprias (J. Abreu) com diferentes estágios ontogenéticos de *Didelphis albiventris*. A ação do ácido nítrico (30%) nos músculos mastigatórios de espécimes filhotes foi bem mais vagarosa (permanecendo até três dias no ácido) do que em subadultos e adultos (ABDALA; FLORES; GIANNINI, 2001) que demonstraram uma ação excessiva em poucas horas (~2-3 h) quando observado. Recentemente, temos utilizado o ácido sulfúrico (10%) aquecido a 60°C na separação das fibras dos músculos mastigatórios de diferentes didelfídeos que têm sido retirados em 20 min-1 h. O tempo em geral é mantido por outros estudos por ao menos algumas horas, mas os músculos podem ficar até 10 dias no ácido (DE SOUZA JUNIOR et al., 2018).

Após o ácido, os músculos devem ser manipulados com cuidado para evitar a quebra das fibras. Eles são secados ou enxaguados e transferidos para uma solução aquosa de glicerina (comumente 50%; MARTIN et al., 2019, usam a 30%) até a separação das fibras. O comprimento médio dos fascículos é obtido ao selecionar aleatoriamente um conjunto de fascículos de diferentes regiões do músculo (LEISCHNER et al., 2018). Um instrumento com menor risco cortante pode ser usado para manusear os músculos e auxiliar na separação cuidadosa das fibras,

como uma pinça ou agulha de ponta romba que devem servir melhor dependendo do tamanho do músculo (HERREL et al., 2008; MARTIN et al., 2019). O uso de lupa auxilia substancialmente na separação das fibras de pequenos músculos. Remover as fibras com os músculos ainda molhados com a glicerina também foi particularmente mais exitoso. A quantidade de fascículos tem sido variável entre os trabalhos e até entre os músculos de um mesmo trabalho, mas é geralmente acima de 10. Os fascículos são medidos diretamente por uma fita métrica, paquímetro ou através de um *software* de visualização de imagens quando fotografadas com escala. O último é mais conveniente para músculos menores e o *software* gratuito ImageJ é frequentemente usado no processamento das imagens.

A média dos comprimentos já pode ser utilizada no cálculo da PCSA de músculos individuais ou para complexos musculares quando são removidos juntos (“em bloco”; LEONARD et al., 2022b). Por exemplo, músculos adutores da mandíbula (e.g., masseter) se subdividem em camadas ou porções que podem se misturar às adjacentes e tornar a separação difícil (HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019). A baixa diferenciação não sugere que os fascículos estão submetidos a demandas funcionais muito distintas que, de outra forma, correria o risco de o comprimento médio ser pouco representativo funcionalmente. Já o comprimento médio dos fascículos de diferentes camadas ou grupos musculares pode ser estimado com uma média ponderada. Hartstone-Rose et al. (2018, 2022), Hartstone-Rose, Hertzig e Dickinson (2019), e Hartstone-Rose, Perry e Morrow (2012), calculam adicionalmente o comprimento do fascículo médio dos adutores da mandíbula escalonando o comprimento do fascículo de cada músculo à massa muscular do músculo.

$$CF_{\text{médio}} = \frac{cf_{TP} \times m_{TP} + cf_{MS} \times m_{MS} + cf_{PT} \times m_{PT}}{m_{TP} + m_{MS} + m_{PT}}$$

onde *cf* é a média do comprimento do fascículo para os músculos adutores da mandíbula (*TP*, *m. temporalis*; *MS*, *m. masseter*; *PT*, *m. pterygoideus*) e *m* é a massa.

O comprimento médio do fascículo também pode ser corrigido para representar um comprimento ótimo e padronizado do sarcômero para produção de força (ANAPOL; BARRY, 1996; TAYLOR et al., 2018; VINYARD; TAYLOR, 2010). Músculos se contraem e produzem tensão através dos sarcômeros, que correspondem às unidades que geram força na fibra muscular. A tensão gerada

depende das interações entre filamentos de actina e miosina. O grau de sobreposição entre elas determina o comprimento do sarcômero. A relação entre o comprimento do sarcômero e a tensão gerada produz uma curva que tem seu pico próximo do comprimento de repouso do sarcômero. Alguns estudos ajustam o comprimento da fibra para considerar o comprimento teórico do sarcômero em repouso (2,3-2,8 μm ; HUXLEY, 1972) e controlar as diferenças de músculos fixados em diferentes graus de excursão e posturas (ANAPOL; BARRY, 1996; TAYLOR et al., 2018; VINYARD; TAYLOR, 2010). Contudo, Hartstone-Rose et al. (2018) consideram essa modificação teoricamente problemática. Todas as fibras corrigidas simultaneamente de diferentes músculos adutores da mandíbula, e até porções musculares, estariam ajustadas para esse comprimento a diferentes níveis de excursão e consequentemente de abertura da boca. A força estimada de um músculo individual seria específica para uma abertura de boca e não aconteceria de todos estarem no comprimento ideal ao mesmo tempo, embora entender esse comprimento e como é alterado relativo à abertura de boca seja interessante (HARTSTONE-ROSE et al., 2018). O mesmo poderia ser pensado para músculos dos membros que se conectam nos mesmos segmentos ósseos e que não se encurtam ou se estendem ao todo.

2.4. Estimativa da PCSA

A PCSA é uma função do volume e comprimento das fibras musculares (LEONARD et al., 2021, 2022b). Abordamos previamente alguns dos métodos utilizados para obter o comprimento médio da fibra. A massa é facilmente medida por uma balança de precisão; músculos de pequenos mamíferos podem exigir uma alta precisão (< 10 mg). A massa pode representar o estado seco ou hidratado dos músculos. Usar a massa seca garante que a medida não seja afetada pelo estado de hidratação e fornece um método de comparação mais confiável (TURNBULL, 1970). Para isso, os músculos são mantidos a uma temperatura constante até que a umidade seja perdida (e.g., MORALES et al., 2018; WARBURTON et al., 2013). No entanto, o uso da massa seca não é comum na literatura e obviamente corresponde a uma massa menor. Isso limitaria as comparações com trabalhos prévios que fornecem valores de PCSA com a massa úmida (MARTIN et al., 2020), embora talvez não impossibilite em relação à contribuição de músculos individuais, se

assumirmos uma mudança proporcionalmente consistente entre músculos de um mesmo espécime (ANAPOL; BARRY, 1996). A massa do músculo hidratado também representa melhor a realidade natural dos músculos (ANAPOL; BARRY, 1996) e a PCSA, quando aplicada em modelos de produção de força, podem resultar em valores bem próximos a medições *in vivo* (BRASSARD et al., 2020a).

O volume muscular é estimado a partir da massa e uma densidade muscular para todos os músculos. As densidades geralmente usadas são de $1,0597 \text{ g.cm}^{-3}$ (algumas vezes arredondado para $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$) de Mendez e Keys (1960), determinado de músculos esqueléticos de cães e coelhos, ou de $1,0564 \text{ g.cm}^{-3}$ de Murphy e Beardsley (1974) com gatos. O uso de uma densidade constante vem sendo discutido e notado como problemático por alguns pesquisadores. Ward e Lieber (2005) mediram a densidade em função do método de fixação de músculos esqueléticos humanos de cadáveres fixados por imersão (formol 4%) e perfusão (formol 37%). A densidade média calculada para amostras fixadas por perfusão mostrou um valor próximo das estimativas anteriores ($1,055 \text{ g.cm}^{-3}$) mas foi diferente das amostras fixadas por imersão, de $1,112 \text{ g.cm}^{-3}$. Mais recentemente, Leonard et al. (2021) também avaliaram o uso generalizado dessas densidades constantes. A aplicação supõe que a densidade muscular é consistente entre músculos de diferentes regiões anatômicas (para a musculatura mastigatória ou dos membros) e ao longo do crescimento (através de diferentes estágios ontogenéticos), mas foram tiradas por Mendez e Keys (1960) e Murphy e Beardsley (1974), dos membros de espécimes adultos. Leonard et al. (2021) investigaram essas suposições em coelhos, e embora tenham achado uma tendência geral de músculos mais densos em indivíduos mais velhos, e diferenças entre as regiões anatômicas, uma medida de densidade constante parece razoável se não for possível medi-la diretamente. Constantes de $1,0558$ e $1,0502 \text{ g. cm}^{-3}$ foram fornecidas para músculos de adultos e juvenis, respectivamente, mas uma variedade de valores estão presentes no estudo (ver Tabela 6 em LEONARD et al., 2021), que deve melhorar a precisão em análises mais específicas, além destes valores serem derivados de uma grande amostra de músculos de diferentes regiões anatômicas e indivíduos de idades diferentes. Leonard et al. (2021) verificaram a densidade através de um kit de medição que usa o princípio de Arquimedes (Mettler Toledo MS-DNY-54). Penrose et al. (2020) usaram uma alternativa para conferir se a densidade de $1,056 \text{ g. cm}^{-3}$ (MURPHY; BEARDSLEY, 1974) seria uma estimativa confiável para calcular a PCSA. O volume

obtido da divisão da massa de músculos adutores de dois espécimes de raposas (*Vulpes*) pela densidade de $1,056 \text{ g.cm}^{-3}$ foi comparado com o medido diretamente por um microvolúmetro usando um método adaptado de Douglass e Wcislo (2010) e Vickerton, Jarvis e Jeffery (2013). Penrose et al. (2020) não encontraram diferenças significativas.

O cálculo da PCSA também pode incorporar o ângulo de penação. Músculos com fibras penadas tendem a gerar mais força muscular com um mesmo volume devido ao maior número de fibras de comprimentos mais curtos. Contudo, o desvio das fibras em relação ao eixo muscular resulta em alguma perda da força (VINYARD; TAYLOR, 2010) e a PCSA não representaria a força gerada ao longo da linha de ação muscular. Assim, costuma-se corrigir a PCSA com a inclinação das fibras. O componente da força que atua perpendicular à linha de ação muscular é eliminado para determinar o vetor na direção da linha de tração (LEISCHNER et al., 2018):

$$PCSA = \frac{m}{\rho \times cf} \times \cos\theta$$

onde o volume muscular foi contabilizado ao dividir a massa do músculo m (g) pela densidade ρ (g.cm^{-3}), cf é o comprimento médio do fascículo muscular (cm) e $\cos$ é o cosseno do ângulo de penação θ entre a fibra e a linha de ação (por vezes correspondida com a disposição do tendão dentro do músculo). Podemos posicionar um transferidor sobre o músculo, fotografá-lo e usar programas de imagem (novamente, como ImageJ) (Figura 4C-D) para medir o ângulo de penação (MARTIN et al., 2019, 2020), ou ainda registrá-lo indiretamente. Se computarmos a distância perpendicular da linha de ação (ou tendão) à extremidade do fascículo no ventre muscular (a) e usar o comprimento do fascículo (cf), podemos estimar o ângulo através do arco seno (ANAPOL; BARRY, 1996):

$$\text{arco seno} \left(\frac{a}{cf} \right) = \theta$$

a pode ser representada como uma medida de espessura muscular (Figura 4E) e tem sido abordada dessa maneira (LEISCHNER et al., 2018; MARCHI et al., 2018). Entretanto, precisamos ter cuidado para que não haja uma má interpretação. A relação trigonométrica com o comprimento do fascículo deve ser válida. Usar a espessura muscular, mesmo que perpendicular à linha de ação, independente do arranjo interno pode conduzir a superestimativas. Idealmente, as medidas devem ser realizadas *in situ*, com o músculo preso ao osso, e realizadas em

diferentes locais para considerar toda a variação (MARTIN et al., 2020). Porém, é comum que o ângulo seja medido com os músculos dissecados, mesmo que o reposicionamento e reorientação do músculo, como um tecido mole, possa alterar a posição angular dos fascículos.

Quando consideramos o efeito do ângulo de penação, a PCSA é reduzida. É comum nos trabalhos apresentarem a PCSA como RPCSA, do inglês “*reduced physiological cross-sectional area*”. No entanto, mesmo que haja a perda, ela é pequena e inferior ao ganho do maior número de fibras dependendo do ângulo de penação (quando pequeno; SINCLAIR; ALEXANDER, 1987). Geralmente, os ângulos de penação nem são considerados quando abaixo de 30°, devido ao seu pequeno efeito (cosseno do ângulo está mais próximo de representar o valor total; MARTIN et al., 2020), além do maior risco de subjetividade (Figura 4C). O ângulo de penação dos músculos dos membros é tipicamente pequeno e com isso pode nem ser levado em consideração (SHAHAR; MILGRAM, 2001; TAVERNE et al., 2018), embora o método tenha sido aplicado inicialmente (ANAPOL; BARRY, 1996). Isso é diferente para músculos mastigatórios que apresentam arranjos mais complexos que até podem criar alguns obstáculos para incorporar a correção. Razões práticas são levantadas devido à alta variabilidade da orientação de fibras e a dificuldade de medir corretamente o ângulo de penação *in situ*. Não seria adequado fazer a medição *ex situ* já que o aparato mastigatório inclui músculos que não possuem contrações lineares simples e que estão envolvidos num sistema que altera a orientação da linha de ação e dos ângulos de penação dependendo do estágio de adução da mandíbula. Além disso, músculos mastigatórios apresentam uma orientação angular em mais de um plano (coronal e parassagital) e a resolução de apenas um deles não seria suficiente. Essas complicações foram apontadas por Hartstone-Rose et al. (2018) que recomendaram calcular a PCSA sem a correção para os músculos mastigatórios até que esses aspectos tridimensionais sejam contabilizados.

2.5. Outros fatores de correção

Alguns fatores devem ser levados em consideração quanto à confiabilidade das informações usadas no cálculo da PCSA. Condições ideais para o estudo comparativo envolvem espécimes sem problemas patológicos na musculatura ou

estrutura óssea, preservados igualmente e na mesma posição para minimizar efeitos na arquitetura de fibra. Isso nem sempre é possível. Enquanto danos podem ser óbvios, é mais difícil obter ou guardar espécimes armazenados em posições anatômicas similares, preferencialmente em repouso (e.g., mandíbulas próximas da oclusão com crânio, membros perpendiculares ao corpo) (MARTIN et al., 2019), caso não sejam diretamente coletados para este fim. Com isso, amostras preservadas em coleções mastozoológicas muito provavelmente combinarão espécimes preservados de diferentes formas e posições, comumente congelados ou em fluídos, especialmente para os pequenos mamíferos. Como a preservação do tecido mole não é ainda muito comum nas coleções mastozoológicas, materiais também armazenados no formol ou etanol fornecem uma fonte de espécimes para a prática desta técnica (LEONARD et al., 2022a). Além disso, práticas de fixação são utilizadas para prevenir alterações na musculatura post mortem (LEONARD et al., 2022a). Martin et al. (2019) por exemplo, fixaram espécimes com danos substanciais de atropelamento em formol para manter as características anatômicas, o que permitiu utilizá-los no estudo. Espécimes também podem ser fixados para facilitar a identificação das delimitações musculares (ver o tópico de dissecação). No entanto, algumas propriedades desses agentes podem produzir mudanças no tecido mole. A necessidade e ultimamente o fornecimento de fatores de correção que aproximam os valores dos espécimes fixados daqueles coletados com o espécime fresco foram investigados para a massa, volume, densidade e comprimento de fibra de músculos submetidos a diferentes preparações. Leonard et al. (2022a) investigaram o efeito do congelamento, descongelamento/congelamento (espécimes descongelados e congelados uma segunda vez), fixação no formol 10% e preservação no etanol 70% depois do formol em músculos específicos de coelhos. O congelamento não impactou significativamente as características musculares, mas os músculos ainda tiveram massas e volumes levemente menores e um ajustamento (multiplicação) com fatores de 1,03 (quando congelados uma vez) e 1,09-1,1 (quando congelados duas vezes) seria razoável. A leve fixação no formol por duas semanas teve um efeito significativo na massa (fator de correção: 1,32) e volume (fator de correção: 1,32). A preservação pós-fixação no etanol 70% reduziu significativamente a massa (fator de correção: 1,69), volume (fator de correção: 1,64) e a densidade muscular (fator de correção: 1,03), por conta do ressecamento. Foram observados espécimes com até seis meses no etanol com intervalos de um, três e seis meses depois da

fixação no formol. Houve um declínio inicial acentuado nos valores musculares que permaneceram relativamente constantes. O mesmo aconteceu quando Leonard et al. (2022b) avaliaram os efeitos do armazenamento do roedor *Mus musculus* no etanol a longo prazo (16-130 anos). Neste estudo, são fornecidos os fatores de correção de 2,64, 2,49, e 1,054 respectivamente para a massa, volume e densidade muscular de músculos do membro posterior. Entretanto, Leonard et al. (2022b) não encontraram um encurtamento significativo do comprimento dos fascículos obtidos quando os músculos estão fixados no esqueleto. É diferente de Kikuchi e Kuraoka (2014) que sugerem um ajuste de 9-13% para compensar o encurtamento do comprimento de fibra, além da redução de 14% para a massa, após um período de fixação no formol. Os músculos em Kikuchi e Kuraoka (2014) foram do membro anterior do primata *Gorilla gorilla* e preservados separados dos ossos. A preservação dos músculos presos aos ossos ou com as extremidades livres, ou armazenados diretamente no etanol ou previamente no formol, parece influenciar a arquitetura muscular. Mesmo o número de ciclos de descongelamento-congelamento pode ser maior que o investigado por Leonard et al. (2022a); eventualmente os freezers são limpos, organizados, passam por instabilidades no provimento de energia, falham, quebram ou diminuem a eficiência quando cheios. Para que os fatores de correção sejam bem empregados, é necessário que o método a qual os espécimes foram armazenados sejam anotados através de protocolos de preservação contendo quando congelados, fixados e armazenados, se previamente foram congelados, e se foram transferidos (e quando) de uma solução para outra, além da composição e concentração das soluções (LEONARD et al., 2022b).

2.6. Perspectivas

A dissecação é um dos modos que possibilita verificar a morfologia e a função muscular em vertebrados (RAYFIELD, 2019). Mudanças na orientação, arquitetura interna, tamanho absoluto ou relativo, grau de diferenciação e subdivisão interna de músculos associados permitem compreender uma possível evolução adaptativa e influências seletivas nos animais, esperadas na execução de um comportamento (HERRING, 1993). Estudos descritivos da musculatura abordam essa adaptação funcional. Warburton, Yakovleff e Malric (2012) compararam os músculos do membro posterior de um canguru arborícola (*Dendrolagus lumholtzi*) com outros

macropodíneos terrestres. A musculatura diferiu substancialmente entre eles e sugere uma relação funcional às demandas mecânicas da locomoção no ambiente arbóreo. Quando compararam músculos relacionados à articulação do tornozelo do *Leopardus wiedii* com *L. geoffroyi*, felinos de hábitos arborícola e terrestre, Morales et al. (2018) registraram diferenças anatômicas e uma musculatura mais forte para realizar a inversão ou estabilizar a articulação quando de cabeça para baixo ou pendurado pelos pés no tronco de árvores. Adaptações musculoesqueléticas dos membros anteriores para cavar também foram achadas em marsupiais peramelemorfos (*Isodon obesulus* e *Macrotis lagotis*) por Warburton et al. (2013). As adaptações refletem a necessidade de os membros produzirem força. Determinados músculos foram grandes e tiveram áreas de inserção ampliadas. Um maior volume muscular aumenta a magnitude de força que um músculo pode produzir, necessária em comportamentos que atuam contra uma resistência mecânica como a do solo durante a escavação (WARBURTON et al., 2013).

As observações anatômicas podem ser apontadas em padrões morfológicos convergentes com outros mamíferos de mesmos hábitos, como arborícolas ou semifossoriais de diferentes linhagens apontados por Warburton, Yakovleff e Malric (2012), e Warburton et al. (2013). No entanto, similaridades anatômicas não estão apenas relacionadas a hábitos similares (MORALES et al., 2018). Tarefas diferentes podem fornecer demandas mecânicas parecidas e conduzir a observações semelhantes (WARBURTON et al., 2013), mas as semelhanças também podem refletir a história filogenética. Dessa forma, informações musculares têm sido associadas a filogenia. de Souza Junior et al. (2018, 2021) geraram um dendrograma das porcentagens de massa de grupos funcionais de músculos do membro torácico numa análise comparativa com carnívoros, encontrando uma alta associação com a filogenia da ordem. Já Diogo et al. (2016) usaram as sinapomorfias musculares compartilhadas por todos os mamíferos e demonstraram a utilidade de estudar músculos para caracterizar certos clados, além de apontar um animal modelo (o gambá, *Didelphis virginiana*) anatomicamente mais plesiomórfico para estudar características ancestrais. De outra forma, podemos incorporar diferentes caracteres na filogenia. Estados de caráter como presença/ausência, local e extensão das áreas de fixação, são coletados de descrições anatômicas e mapeados através das relações entre os táxons (DRUZINSKY; DOHERTY; DE VREE, 2011).

Para que as comparações miológicas entre os animais sejam adequadas para estudos de ajuste morfofuncional, devemos incluir táxons proximamente relacionados, que exibem hábitos reconhecidamente diferentes e tamanhos similares. A diferença não seria atribuída a história filogenética ou ao tamanho, devido às demandas do maior ou menor corpo (MORALES et al., 2018). Embora táxons próximos com hábitos distintos já estejam incluídos no interesse do estudo, o tamanho é uma das principais fontes de variação dentro de determinados grupos de mamíferos (MARROIG et al., 2009; SHIRAI; MARROIG, 2010). É difícil eliminar seu efeito numa abordagem descritiva, mas dados quantitativos são ajustáveis. Podemos converter os valores de massa e PCSA dos músculos individuais ou grupos funcionais como uma porcentagem da massa total (OISHI et al., 2008; WARBURTON, 2009; WARBURTON et al., 2013). Medidas corpóreas podem dividir os valores para fornecer uma estimativa relativa ao tamanho (PARMENTER et al., 2020; PERRY; WALL, 2008; TAYLOR et al., 2018) ou serem relacionadas ao tamanho (por regressão) quando com um número amostral maior. O tamanho pode ser representado pela massa corpórea ou pelo comprimento de um segmento ósseo. Em estudos com os músculos mastigatórios, são usadas medidas da mandíbula ou crânio, ou uma média de medições. Os resíduos de regressões lineares representam a variação não explicada pelo tamanho e são incorporados em análises comparativas (HARTSTONE-ROSE et al., 2018). Também podemos usar as regressões para verificar como a variável muscular escala com um estimador de tamanho corpóreo. Deve-se ter em mente que medidas de área, como a PCSA, e volumétrica, como a massa, aumentam em ritmos diferentes que medidas lineares (ANAPOL; SHAHNOOR; ROSS, 2008). Quando usadas, dados de PCSA e massa são linearizados (tirados a raiz quadrada e cúbica) e convertidos em seus logaritmos para que escalem com similaridade geométrica e a inclinação isométrica seja 1 (HARTSTONE-ROSE et al., 2018, 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012). As variáveis são isométricas com a massa corpórea (m) quando a massa muscular escala com m^1 , PCSA com $m^{0.67}$ e comprimento do fascículo com $m^{0.33}$ ou com inclinações para a isometria igual 1, 0,67 ou 0,33, respectivamente (MANDARIM-DE-LACERDA, 2019; MARTIN et al., 2020). Os limites inferior e superior do intervalo de confiança (geralmente 95%; $\alpha = 0,05$) entre as variáveis musculares e os indicadores de tamanho indicam se foram diferentes da isometria (MARTIN et al., 2019). Massa,

comprimento médio do fascículo muscular e PCSA quando escalonados em grupos de mamíferos parecem mostrar uma tendência. A massa escala com isometria ou alometria positiva enquanto o comprimento médio do fascículo escala com isometria ou alometria negativa. A tendência de indivíduos maiores terem uma massa muscular relativamente maior e o comprimento do fascículo relativamente menor resulta na alometria positiva da PCSA para a maioria dos táxons e musculatura de diferentes regiões (HARTSTONE-ROSE et al., 2018, 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012; LEISCHNER et al., 2018; MARCHI et al., 2018; MARTIN et al., 2019; PERRY; WALL, 2008).

Em adição às informações musculares, a morfologia funcional combina outros elementos de análise (HERRING, 1993; SCHWENK, 2000). Por exemplo, análises biomecânicas podem ser aliadas ao estudo das mudanças na arquitetura muscular (RAYFIELD, 2019; WARD; LIEBER, 2005). Embora a PCSA seja uma medida proporcional à produção de força, ela sozinha não determina o quanto dessa força é empregada pelo sistema. A eficiência com que a força muscular é transmitida a um determinado ponto é indicada pela vantagem mecânica – uma medida de análise de sistemas de alavanca (GREAVES, 2012; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019).

Sistemas musculoesqueléticos podem ser representados como sistemas de alavanca: uma barra rígida (osso) a qual se aplica a força muscular que a rotaciona sobre um eixo (articulação), e uma força que resiste ao movimento, em reação à força muscular, como o peso do segmento, resistência da comida ou do solo. As diferentes organizações desses componentes resultam em classes de alavanca distintas: I, a articulação se posiciona entre as duas forças; II, resistência entre a articulação e a força muscular; III, força muscular entre a articulação e a resistência. Como a vantagem mecânica pode ser calculada como a relação entre o braço de alavanca muscular (distância perpendicular entre a articulação e a ação da força muscular) e o da resistência (distância perpendicular entre a articulação e a ação da força de resistência), os tipos de classe II e III enfatizam diferentes características do sistema de alavanca. Uma alavanca de classe II fornece uma vantagem mecânica mais alta para a força muscular enquanto a de classe III é mais desvantajosa mecanicamente para essa força, mas comumente achada nos sistemas ósseos. Isso significa que menos da força muscular está sendo transmitida numa alavanca de

classe III e quanto mais distante for a força da articulação relativa a resistência, uma maior a quantidade da força muscular poderia ser transmitida. A força seria aproveitada em diversos comportamentos como na mordida, escavação, propulsão ou escalada (GREAVES, 2012; WARBURTON et al., 2013; WARBURTON; YAKOVLEFF; MALRIC, 2012).

Por outro lado, a ação muscular nos sistemas de alavanca com uma baixa vantagem mecânica possibilita movimentos mais rápidos do segmento. O quanto a vantagem mecânica estaria favorecendo a força ou a velocidade tem sido pensado responder as variações dos requisitos mecânicos entre os táxons e seu uso pode oferecer correlações funcionais o estudo anatômico muscular (BECERRA et al., 2014; MISSAGIA et al., 2021). As medidas de comprimento dos braços de alavanca dos músculos usam os locais de origem e inserção para estimar a linha de ação muscular (conectando as fixações ou os centroides das áreas de fixação quando amplas) igual a orientação da força muscular (BECERRA et al., 2014; DEUTSCH et al., 2020). Já definir a orientação da força de resistência é mais complexo e menos previsível (BRASSARD et al., 2020a; CLEUREN; AERTS; DE VREE, 1995; HERREL; AERTS; DE VREE, 1998). Podemos considerar diferentes orientações em que a resistência está sendo aplicada, mas é comum que seja abordado de uma maneira mais simples que isso, usando apenas a distância ao ponto em que a força seria aplicada e não perpendicular a uma orientação definida (DEUTSCH et al., 2020; HARTSTONE-ROSE et al., 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012). De maneira similar, isso também tem sido empregado para a força muscular em um modelo simplificado da vantagem mecânica. Os braços de alavanca são medidos nesse modelo como a distância entre articulação e os locais de inserção dos músculos, e entre a articulação e o ponto em que a resistência estaria posicionada. A localização relativamente mais distal das inserções musculares e redução dos segmentos ósseos resultariam em vantagens mecânicas aprimoradas, como tem sido interpretada em descrições anatômicas (WARBURTON et al., 2013; WARBURTON; YAKOVLEFF; MALRIC, 2012). Esse modelo simplificado tem sido aplicado de maneira consistente em especial no aparato mastigatório, quando mandíbula não está em oclusão para estimativa das linhas de ação muscular (COX et al., 2020; MISSAGIA et al., 2021; PENROSE et al., 2020; SWIDERSKI; ZELDITCH, 2010). Entretanto, os resultados devem ser abordados com alguma cautela. Os

comprimentos dos braços de alavanca não consideram a orientação da força muscular e podem não ser representativos para a distância perpendicular da articulação às linhas de ação muscular (SWIDERSKI; ZELDITCH, 2010).

A magnitude da força que é transmitida pelo sistema pode ser estimada da força muscular e o modelo de alavanca em equilíbrio estático (GREAVES, 2012). Podemos usar a PCSA para obter uma estimativa da força muscular, quando escalonada a um valor de estresse muscular, geralmente tirado da literatura (25-30 N.cm⁻², HERZOG, 1994; 3 kg.cm⁻², CLOSE, 1972; 37 N.cm⁻², WEIJS; HILLEN, 1985; ver: DEUTSCH et al., 2020; FABRE et al., 2017; GINOT et al., 2018; HARTSTONE-ROSE et al., 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012; HERREL et al., 2008; PENROSE et al., 2020). A tendência da força rotacionar a alavanca, denominada de momento, é calculada como um produto da força e sua distância perpendicular ao eixo (braço de momento, similar ao braço de alavanca mencionado anteriormente) (GREAVES, 2012). O momento da resistência tende a rotacionar a alavanca no sentido contrário ao momento da força muscular. Na condição de equilíbrio estático, como eventualmente pode ocorrer durante o movimento (e.g., quando a mandíbula para ao alcançar a comida ou o crânio; GREAVES, 2012), a soma dos momentos é igual a zero:

$$\vec{M}_{\text{Músculo}} + \vec{M}_{\text{Resistência}} = 0 \text{ ou } F_M \times d_M + F_R \times d_R = 0$$

onde F_M é a força muscular, F_R é a força da resistência, d_M é o braço do momento muscular e d_R é o braço do momento da resistência.

Combinando a força muscular e os braços de momento da força muscular e da resistência, podemos estimar a magnitude da resistência suportada pelo músculo atuando maximamente. O valor máximo é deduzido da soma dos momentos dos músculos que participam do comportamento ($\vec{M}_{\text{Resistência}} + \sum \vec{M}_{\text{Músculos}} = 0$). É fácil demonstrar isso quando aplicado no aparato mastigatório como tem sido usado para estimar força de mordida máxima – de igual em magnitude e oposta a resistência máxima que seria aplicada pela comida (BRASSARD et al., 2020a). O uso da morfologia e arquitetura muscular nestes modelos tem fornecido boas previsões de desempenho (BRASSARD et al., 2020a, 2021; GINOT et al., 2018; HERREL et al., 2008; SANTANA; DUMONT; DAVIS, 2010). Indicadores morfométricos para as medições musculares também têm correspondido bem aos resultados *in vivo*.

Particularmente, essas estimativas se destacam no estudo morfológico pois estão sujeitas a uma menor limitação metodológica e do poder estatístico, uma vez que as informações musculares podem possuir grandes componentes de variação anatômica que é difícil discriminar como adaptativas ou do indivíduo (DAVIS, 1964) se um grande número de espécimes não for dissecado. Por outro lado, informações morfométricas possibilitam que grandes amostras sejam acessadas com uma grande amplitude sistemática, embora essas previsões ósseas devam ser avaliadas através de medições empíricas (SICURO et al., 2021). Mesmo que a relação entre o desempenho e dimensões morfométricas já tenha sido investigada com mamíferos (BRASSARD et al., 2021; CHAZEAU et al., 2013; ELLIS et al., 2008; SICURO et al., 2021), medições diretas de comportamentos dificilmente poderiam ser alcançadas para determinados grupos de mamíferos. Nesses casos, em vez da força ser medida diretamente, podemos usar uma estimativa relativa para a força máxima potencial. Indicadores com aproximações volumétricas, que considera a espessura muscular (e.g., secções transversais do método de Thomason; THOMASON, 1991) (Figura 1E), parecem fornecer correlações mais fortes com o tamanho e PCSA (DICKINSON et al., 2021). Além de serem bem explorados em estudos morfométricos do crânio para inferências da musculatura, quando aliados aos do sistema de alavanca da mandíbula, também têm sido validados empiricamente como indicadores para o desempenho (SICURO et al., 2021).

A relação anatômica e mecânica entre os músculos e os ossos também possibilita a inferência da anatomia e função muscular em táxons extintos (Paleomiologia; PERRY; PRUFROCK, 2018). Propriedades musculares, como da arquitetura de fibra, dificilmente seriam caracterizadas diretamente nos fósseis. Nesse caso, podemos usar os indicadores osteológicos preditivos de análogos existentes para estimar essas variáveis. Perry, St Clair e Hartstone-Rose (2015) testaram e usaram dimensões osteológicas relacionadas ao tecido mole de estrepssirinos existentes para estimar o tamanho e PCSAs dos músculos mastigatórios de primatas adapídeos. Adicionalmente, a alavancagem e força de mordida também foi estimada. Já Fahn-Lai, Biewener e Pierce (2020) caracterizaram a morfologia e arquitetura de fibra de músculos do ombro de táxons existentes morfologicamente conservados (*Didelphis virginiana* e *Salvator merianae*) que servem como modelos para reconstruir a anatomia muscular em fósseis de sinapsídeos não-mamíferos como demonstrado ao inferir PCSAs no cinodonte

não-mamífero *Massetognathus pascuali*. Esses registros demonstram como inferências de características musculares podem ampliar a nossa compreensão da participação muscular na reconstrução e evolução funcional.

Finalmente, é errado assumir que estudos da musculatura sejam considerados onerosos ou defasados quando a morfologia descritiva e funcional continuam sendo necessárias e indispensáveis para a compreensão da evolução de mamíferos (FORD et al., 2023). Este manuscrito foi dedicado a apresentar as possibilidades de uso das informações musculares obtidas da dissecação, um método pouco custoso e acessível. Esperamos que os métodos dispostos aqui auxiliem no desenvolvimento de estudos futuros, em particular com mamíferos Brasileiros e Neotropicais.

Este capítulo foi publicado pela *Brazilian Journal of Mammalogy*: Abreu, J. A. F. de H., Guilhon, G. N., & Astúa, D. (2023). Técnicas para o estudo da musculatura em pequenos mamíferos: dissecação clássica e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA). *Brazilian Journal of Mammalogy*, (e92), e202392111. <https://doi.org/10.32673/bjm.vie92.111> (ver Apêndice)

3. CAPÍTULO 2. Ontogenia pós-natal dos músculos mastigatórios de *Didelphis albiventris* (Lund, 1840) (Didelphimorphia, Didelphidae)

3.1. Introdução

Embora o aparato mastigatório dos mamíferos esteja envolvido em diversas funções além da alimentação (HERRING; HERRING, 1974), sua morfologia parece ser influenciada principalmente pelos hábitos alimentares. Diferentes dietas correspondem a diferentes aspectos morfológicos e funcionais do aparato mastigatório (SHI et al., 2020) que combinam informações de anatomia, mecânica e comportamento (HERRING, 1993). Diversos estudos têm demonstrado a interação entre esses parâmetros com o desempenho do sistema mastigatório (BINDER; VAN VALKENBURGH, 2000; LA CROIX et al., 2011; DUMONT et al., 2009), particularmente através de modelos biomecânicos (BRASSARD et al., 2020b; COX et al., 2020; ELLIS et al., 2008, 2009; FABRE et al., 2017; HARTSTONE-ROSE et al., 2018, 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012; SANTANA; DUMONT; DAVIS, 2010; TANNER et al., 2009; TAYLOR et al., 2018). A maioria dos estudos os utilizam para avaliar variações interespecíficas e relações com a dieta. Poucos, porém, se preocupam em analisar como variam ao longo do desenvolvimento individual, mesmo quando tais variações fenotípicas e funcionais dependem das mudanças ontogenéticas às quais o aparato mastigatório foi submetido (ADAMS; PEDERSEN, 2000; ASTÚA; GUILHON, 2022; FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2022; FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018; HERREL; GIBB, 2006; HERRING, 1993; LANGENBACH; WEIJS, 1990).

As mudanças relacionadas à idade são facilmente observadas em marsupiais (FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2003; PETRIDES, 1949). Diferente dos placentários, os marsupiais possuem um período relativamente curto de gestação intrauterina e nascem com um desenvolvimento anatômico mínimo (CLARK; SMITH, 1993; JURGELSKI, 1984; SMITH; KEYTE, 2020), particularmente dos membros anteriores e aparato oral para escalar a mãe e se fixar na teta (GEMMELL; VEITCH; NELSON, 2002). Até começar a se alimentar, os neonatos possuem o crânio ossificado na região oral e músculos da língua bem organizados que iniciam a maturação antes do nascimento (BENNETT; GOSWAMI, 2013; CLARK; SMITH, 1993; SMITH; KEYTE,

2020). Contudo, mudanças morfológicas mais marcantes no sistema alimentar ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal, especialmente quando indivíduos desmamados desenvolvem características para a mastigação adulta (LANGENBACH; WEIJS, 1990; STANCHAK; FAURE; SANTANA, 2023). Essas mudanças geralmente incluem alterações morfológicas na cabeça para os hábitos alimentares e o desenvolvimento da oclusão dentária (GORNIK, 1985; HERRING, 1985).

Os componentes básicos do aparato mastigatório em mamíferos são o crânio, mandíbula e músculos mastigatórios. A ontogenia do crânio e da mandíbula foi investigada nos principais grupos de marsupiais vivos (FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2022), em especial com os do Novo Mundo (ABDALA; FLORES; GIANNINI, 2001; FLORES et al., 2015; FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2010; FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018, 2003; GIANNINI; ABDALA; FLORES, 2004). Em particular, Didelphidae representa a maior radiação de marsupiais fora da Australásia, constituindo a maioria das espécies americanas e quase um terço de todos os marsupiais (ASTÚA; CHEREM; TETA, 2022). As principais mudanças ontogenéticas no crânio dos didelfídeos estão associadas ao aparato mastigatório (FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018). Em Flores, Giannini e Abdala (2018), a maioria das medições cranianas seguiu padrões alométricos de crescimento que acompanham a transição para o desempenho adulto. De modo geral, o crânio cresceu de forma variável com o comprimento e a largura zigomática, normalmente resultando em crânios curtos e amplos, ou longos e estreitos, que parecem corresponder com a dieta. O comprimento do rosto também mostrou uma relação com os hábitos alimentares, mas cresceu principalmente com alometria positiva (indicado pelo crescimento dos nasais). A combinação entre a isometria do comprimento e a largura “negativa” do palato foi mais frequente e aponta para uma forma mais curta e ampla no início do desenvolvimento. Esse palato é tipicamente associado a uma plataforma para suportar a língua durante a amamentação (FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2022). Em contrapartida, a interação entre o crescimento da largura zigomática e consistentemente negativo da largura da caixa craniana fornece o espaço para a musculatura adutora da mandíbula. As medidas do processo coronóide, por onde se insere o *m. temporalis* (principal músculo adutor), e do corpo da mandíbula cresceram predominantemente com alometria

positiva, indicando o aumento do tamanho e força da mandíbula (FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018).

As trajetórias ontogenéticas que descrevem o aumento do espaço para disposição dos músculos adutores da mandíbula, destacam uma maior capacidade do aparato mastigatório de produzir forças de mordida mais fortes à medida que cresce. Isso indica que indivíduos mais jovens enfrentam um desafio maior logo cedo no desenvolvimento, quando se tornam independentes e ainda possuem um tamanho menor, músculos menos desenvolvidos, crânio e mandíbula pouco robustos e com a dentição incompleta. Uma maneira de compensar a força de mordida seria o aprimoramento biomecânico do aparato no início da ontogenia (BINDER; VAN VALKENBURGH, 2000). A vantagem mecânica (considerando a mandíbula como uma alavanca; CLEUREN; AERTS; DE VREE, 1995) pode ser estimada da relação entre os braços de alavanca dos músculos e da resistência (ou mordida) aplicada nos dentes (LA CROIX et al., 2011; TANNER et al., 2009). Quanto mais curta a distância separando a articulação do ponto de mordida em relação a distância entre a articulação e a ação muscular, mais alta é a vantagem mecânica. Essa abordagem tem sido aplicada de maneira consistente nos mamíferos, inclusive em estudos ontogenéticos (BECERRA et al., 2014; COX et al., 2020; LA CROIX et al., 2011; FABRE et al., 2017; MISSAGIA et al., 2021; PENROSE et al., 2020; SWIDERSKI; ZELDITCH, 2010; TANNER et al., 2009). Nos didelfídeos, Thompson, Biknevicius e German (2003) investigaram a vantagem mecânica na ontogenia do crânio de *Monodelphis domestica* usando o modelo restrito de alavanca. Esse modelo considera a articulação dos dois lados da mandíbula e posiciona a força muscular resultante de forma que não cause danos na articulação temporomandibular (GREAVES, 2012), geralmente na linha média devido a contração simétrica dos músculos em cada lado (SINGLETON, 2015; THOMPSON; BIKNEVICIUS; GERMAN, 2003). Thompson, Biknevicius e German (2003) mostraram que juvenis de *M. domestica* não compensam seu sistema alimentar mais deficiente melhorando a vantagem mecânica dos músculos adutores. O resultado se assemelha ao de La Croix et al. (2011) e Tanner et al. (2009) com outros mamíferos, mesmo usando o modelo mais simples de mecânica de alavanca. Embora esses estudos não se estendam amplamente a outros gêneros de didelfídeos, a vantagem mecânica tem sido apontada de maneira indireta nos estudos ontogenéticos do

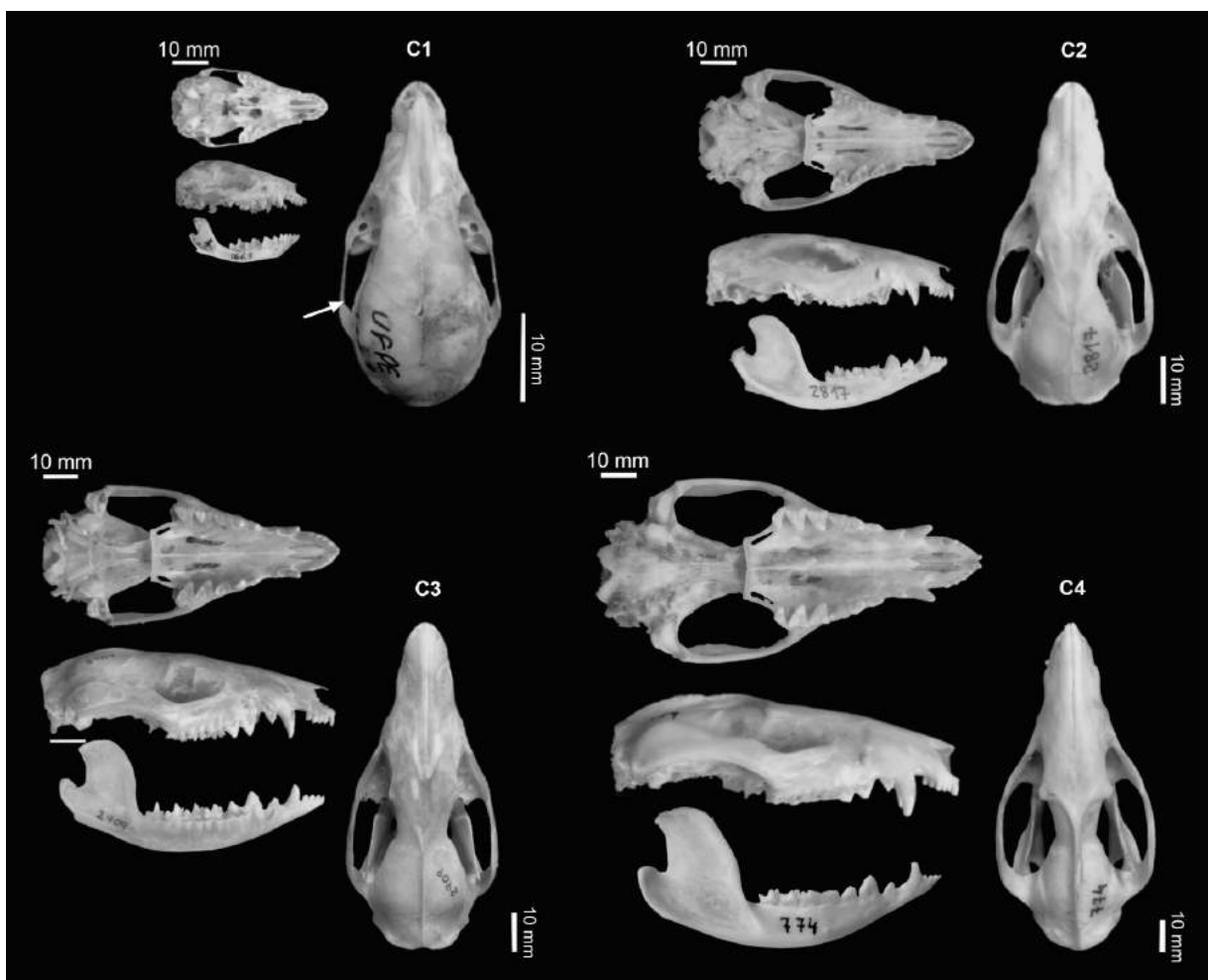
crânio com o comprimento do rostro e variáveis da mandíbula (FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2022).

A morfologia muscular mastigatória, por outro lado, é raramente investigada nos didelfídeos (DIOGO et al., 2016). Mesmo que o crânio e mandíbula tenham sido estudados com detalhe (ABDALA; FLORES; GIANNINI, 2001; ASTÚA; 2010, 2015; FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2010; FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018, 2003), inclusive fornecendo inferências para a morfologia muscular (ASTÚA DE MORAES, 1998; ASTÚA DE MORAES et al., 2000; SILVA-NETO; PAVAN; ASTÚA, 2023), *Didelphis* é o único gênero que possui a anatomia dos músculos mastigatórios bem documentada (ASTÚA; GUILHON, 2022; COUES, 1872; DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; HIIEMAE; JENKINS, 1969; MINKOFF et al., 1979; TURNBULL, 1970). Seu aparato se assemelha ao dos carnívoros com a dominância do músculo *temporalis*, seguido pelo *m. masseter* e *m. pterygoideus*, mas é considerado como generalizado por apresentar características intermediárias a outros grupos especializados (TURNBULL, 1970). Isso combina com o hábito generalista do gênero, que se adaptou bem às cidades e possui uma distribuição ampla na América (ASTÚA; CHEREM; TETA, 2022). Além disso, Diogo et al. (2016) demonstraram que *Didelphis* mantém uma morfologia anatomicamente mais plesiomórfica entre os mamíferos, como já vinha sendo apontado para os gambás (CLARK; SMITH, 1993; HIIEMAE; JENKINS, 1969; RADINSKY, 1987; WEIJS, 1994). Devido essa morfologia conservada e fácil captura (favorecida pela distribuição e maior tamanho), *Didelphis* serve como modelo para a morfologia primitiva e oferece um plano básico para o estudo de evolução morfológica (FAHN-LAI; BIEWENER; PIERCE, 2020; RADINSKY, 1987), ou mais especificamente do desempenho mastigatório (DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; THOMASON; RUSSELL; MORGELI, 1990).

O padrão de crescimento pós-desmame do crânio dentro do gênero *Didelphis* foi estudada em *D. albiventris* por Abdala, Flores e Giannini (2001). Muitas das modificações também podem ser relacionadas a transição funcional da amamentação para a mastigação ativa. Essas mudanças representam ampliações e aprimoramentos das áreas de fixação ou espaço de acomodação da musculatura mandibular, como é sugerido pelo desenvolvimento das cristas sagital e nugal, e de protuberância ou processos no crânio e mandíbula (Figura 1). A combinação da alometria negativa da caixa craniana com a isometria da largura zigomática (ABDALA; FLORES; GIANNINI, 2001) indica um aumento do espaço entre o arco e

a parede do crânio para os músculos adutores da mandíbula à medida que o animal cresce. Apesar dessas inferências, o estudo ontogenético do aparato mastigatório permanece incompleto sem que a anatomia muscular seja investigada, especialmente quando as áreas de inserção podem não escalar da mesma maneira que as características musculares (DICKINSON et al., 2021).

Figura 1. Vistas ventral do crânio, lateral do crânio e mandíbula, e dorsal do crânio e a mandíbula em oclusão, de representantes das quatro classes de idade usadas na separação dos exemplares. Crânios adultos (C3 e C4) possuem as cristas sagitais e nucais bem desenvolvidas, rostros mais afilados e uma constrição pós-orbital proeminente. O crânio nos mais jovens tendem a ter um focinho mais curto, com uma caixa craniana arredondada que mantém um contato próximo com o processo coronóide da mandíbula (seta). A constrição pós-orbital é ausente nesses indivíduos.



Fonte: O autor (2023)

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi descrever o desenvolvimento pós-natal dos músculos mastigatórios de *D. albiventris* ao longo de sua ontogenia, e fornecer um modelo para estudos relacionados ao desenvolvimento da musculatura adutora em Didelphidae. Para isso, dissecamos uma série de crânios de *D. albiventris*, de indivíduos infantis à adultos, e registramos as informações das

fixações musculares e interação com a estrutura crânio-mandibular associada a parâmetros do desempenho mastigatório. Esperamos que os resultados correspondam às mudanças críticas na alimentação, quando ocorre a transição da amamentação para a alimentação adulta.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Amostra

Dissecamos os músculos mastigatórios de 21 espécimes de *D. albiventris* depositados na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Separamos os indivíduos em quatro classes etárias determinadas pela inspeção da erupção dentária nos crânios limpos após a dissecação: Classe 1 (C1), anterior a erupção do primeiro molar superior (M1) (9 espécimes); Classe 2 (C2), que ainda retém o pré-molar decíduo superior (dP3) (3 espécimes); Classe 3 (C3), mostram os pré-molares sucessores (P3) mas sem o quarto molar superior (M4) ou ele não totalmente erupcionado (1 espécime); Classe 4 (C4), adultos, com a série molar superior completa (8 espécimes). O dente não foi considerado erupcionado até se alinhar em oclusão, mesmo que tenha irrompido do alvéolo dentário (mesmo critério usado por VAN NIEVELT E SMITH, 2005). As três últimas classes são equivalentes aos estágios de idade de juvenis, subadultos e adultos, respectivamente, usados por Abdala, Flores e Giannini (2001), com base em Regidor e Gorostiague (1990). A idade estimada dos espécimes varia entre (<3,5) - (>9) meses, baseado no início (M2; ver REGIDOR; GOROSTIAGUE, 1990, 1996) e finalização do estágio de erupção molar. É provável que os espécimes mais jovens ainda estivessem mamando, como alguns ainda foram coletados junto à mãe lactante, e adultos alcancem até 13 meses de idade, já que foi demonstrado desgaste em alguns dos molares (REGIDOR; GOROSTIAGUE, 1990).

3.2.2. Dissecação

A massa corpórea dos indivíduos alcançou de 5.1 - 920 g com comprimentos do crânio de 21.9 - 89 mm. As cabeças foram congeladas ou depositados em álcool (70%) com a mandíbula próxima da oclusão. A dissecação foi baseada em descrições

prévias (DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; TURNBULL, 1970) que incluem músculos com ação direta na mastigação e deglutição: *temporalis*, *masseter*, *pterygoideus medialis*, *digastricus*, *mylohyoideus* e *geniohyoideus* (HIIEMAE; JENKINS, 1969). A nomenclatura miológica seguiu Diogo et al. (2016). Os locais de origem e inserção dos músculos no crânio e mandíbula e as direções das fibras foram inspecionados e serviram para delimitar as porções dentro dos grupos musculares. Essas características foram comparadas entre as classes, usando a terminologia osteológica de Wible (2003) quando pertinente. Cada etapa da dissecação ocorreu sob o um estereoscópio e foi registrada a partir de fotografias para o mapeamento das áreas de fixação. Os músculos removidos foram colocados a uma solução aquosa de etanol (70%), posteriormente secados e pesados numa balança digital (0,01g, Marte AD3300). A massa representou o músculo de um dos lados da cabeça quando retirados intactos; músculos seccionados ou danificados para a identificação anatômica não foram considerados, o que resultou num N diferente dependendo do músculo. Os espécimes no álcool tiveram as massas corrigidas em 40% baseado em Leonard et al. (2022a). Todos os filhotes (indivíduos C1) tiveram as massas inferiores a 0.01 g e não foram computadas.

3.2.3. Modelo biomecânico

A vantagem mecânica dos principais adutores foi estimada para os indivíduos dissecados das classes C2 a C4 utilizando um modelo bidimensional de alavanca (GREAVES, 2012); indivíduos C1 não foram contabilizados já que não exercem uma mordida ativa. As medidas foram tiradas digitalmente de fotografias da visão lateral do crânio articulado com a mandíbula. A vantagem mecânica foi calculada como a relação entre os braços de alavanca dos músculos *temporalis* e *masseter*, e da força de reação no canino e primeiro molar (que representa a força de mordida; BRASSARD et al., 2020b), para todas as combinações. Os braços de alavanca das forças musculares foram computados como a distância perpendicular do ponto médio da articulação temporomandibular (centro de rotação) à linha de ação que conecta os centroides das áreas de origem e inserção muscular no crânio e mandíbula. As áreas foram delimitadas a partir das fotografias das disseções e cicatrizes na superfície óssea. Os braços de alavanca da mordida foram estimados como a distância perpendicular da articulação temporomandibular ao vetor da força

de reação nos dois pontos de mordida. A orientação dessa força é particularmente difícil de prever, mas consideramos uma orientação de $\sim 90^\circ$ relativa à linha de oclusão que passa entre os incisivos e a articulação temporomandibular. Todas as medidas foram obtidas com o imageJ 1.53k (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

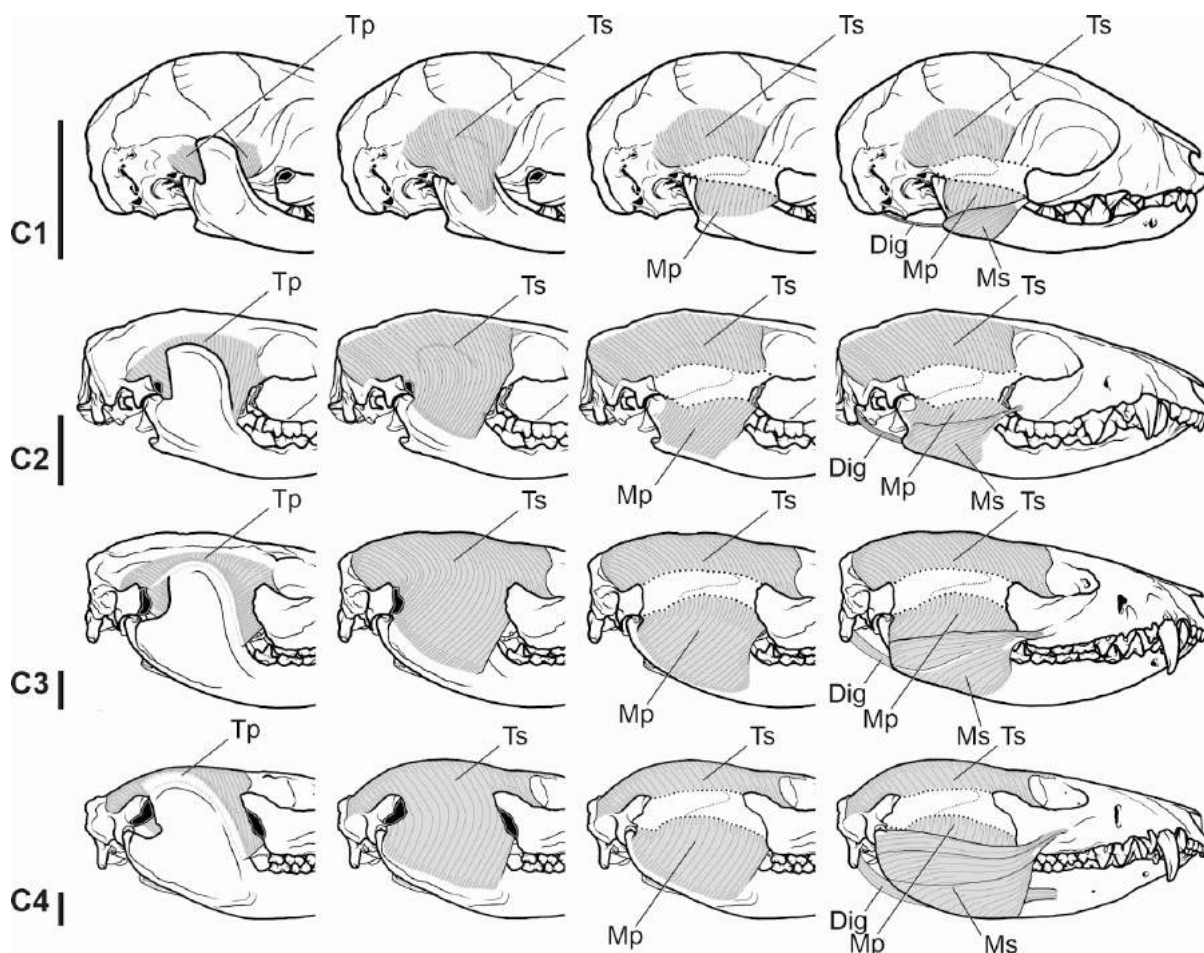
3.2.4. Análise de dados

Realizamos regressões de principal eixo reduzido (RMA) com os dados de massa muscular com dois indicadores do tamanho, comprimento do crânio e massa corpórea, para identificar os padrões de escalonamento com o desenvolvimento dos indivíduos. As regressões da vantagem mecânica foram realizadas apenas com o comprimento do crânio. As massas musculares representaram a massa individual dos músculos adutores da mandíbula (*temporalis*, *masseter*, *pterygoideus medialis*), a massa total da musculatura adutora (somando os valores individuais dos músculos adutores), do *digastricus* e do *mylohyoideus* mais o *geniohyoideus*. O crânio foi medido diretamente nos espécimes dissecados com o auxílio de um paquímetro digital, determinado entre os côndilos occipitais e o ponto mais anterior da maxila. A massa corpórea, quando disponível, foi obtida dos protocolos de preparação dos espécimes.

Antes da análise, todos os dados foram transformados para seu logaritmo de base 10. O coeficiente angular (b) descreve a inclinação da reta de regressão e foi usado para acessar os desvios da isometria. As medidas de massa foram linearizadas com a raiz cúbica quando escalonados com a medida linear do crânio, para padronizar a isometria igual a 1 (JUNGERS; GERMAN, 1981; MANDARIM-DE-LACERDA, 2019). Os desvios da isometria foram testados usando testes-t em adição aos intervalos de confiança 99.8%. O nível de significância foi 0.002 (após a correção de Bonferroni de alfa 0.05) mas foi considerado uma evidência moderada para p entre 0.002-0.05 (similar a FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2003; MUFF et al., 2022). Embora *D. albiventris* apresente dimorfismo sexual no tamanho quando adultos (ASTÚA, 2010), os sexos não foram abordados separadamente devido à limitação da amostra. As regressões foram conduzidas no PAST e usamos o modelo linear no RStudio 4.1.3 (RSTUDIO TEAM, 2020) para confecção dos gráficos com a função ggplot (WICKHAM et al., 2019) do Tidyverse.

3.3. Resultados

Figura 2. Músculos *Temporalis, pars superficialis* (Ts) e *pars profunda* (Tp); *masseter, pars superficialis* (Ms) e *pars profunda* (Mp); e *digastricus* (Dig), em visão lateral do crânio dos indivíduos C1 à C4.



Fonte: O autor (2023)

3.3.1. Descrição anatômica

Masseter

O complexo *masseter* apresentou duas porções, *pars superficialis* e *pars profunda*, em todas as classes dissecadas. O *masseter pars superficialis* se originou acima dos últimos dentes molares superiores, posteriormente na maxila, e se inseriu inferiormente no processo angular da mandíbula (Ms; Figuras 2, 3 e 4), com as fibras correndo principalmente em direção posteroventral. A origem é facilmente identificada nos indivíduos mais maduros (C3 e C4) através de uma protuberância

na maxila, que é menos evidente nos mais jovens (C1 e C2). Nos infantis C1, em especial, se fixou através da fáscia massetérica no periósteo da maxila. A fáscia massetérica cobre as duas porções do masseter, mas foi mais espessa sobre o *masseter pars superficialis* ao longo de sua extensão anterior na maxila e posterior na região auricular. Esse caráter delimitou bem o masseter superficial em C1 e C2 e até o marcou superficialmente em C4. A origem tendinosa do masseter superficial em C3 e C4 se posicionou acima de M3 e entre M3-M4 respectivamente, mas um número de fibras se fixou mais anteriormente entre o m. *levator labii superiores* e o m. *buccinatorius*. O *masseter pars superficialis* também se estendeu sobre a borda caudoventral da mandíbula ao longo do desenvolvimento (Ms; Figura 4). As fibras adicionadas posteriormente tiveram ângulos de inclinação menores e até foram horizontais (Ms; Figura 2), resultando numa maior diversidade na orientação das fibras. Apenas em um espécime de C4 foi visualizado um tendão adicional mais próximo da inserção na mandíbula, fixado no corpo mandibular, abaixo do *buccinatorius* e na linha do terceiro molar inferior (C4-Ms; Figura 2), mas projeções de fibras foram identificadas nessa região em outros espécimes.

O *masseter pars profunda* é parcialmente coberto pelo *masseter pars superficialis* exceto quando próximo da origem no arco zigomático (Mp; Figura 2). As fibras desse músculo partiram da superfície medial do arco zigomático e inseriram inferiormente na fossa massetérica no ramo mandibular (Mp; Figuras 4). Assim como a porção superficial do masseter, as fibras do masseter profundo são orientadas anteriormente, mas se diferenciam por um trajeto mais vertical (Mp; Figura 2). Seu posicionamento seguiu relativamente constante entre as classes a não ser pela extensão na fossa em direção a linha massetérica no limite ventral (Mp; Figura 4). Embora desde C2 se aproxime da borda ventral e posterior da mandíbula, a massa muscular se distribuiu mais próximo da origem.

Temporalis

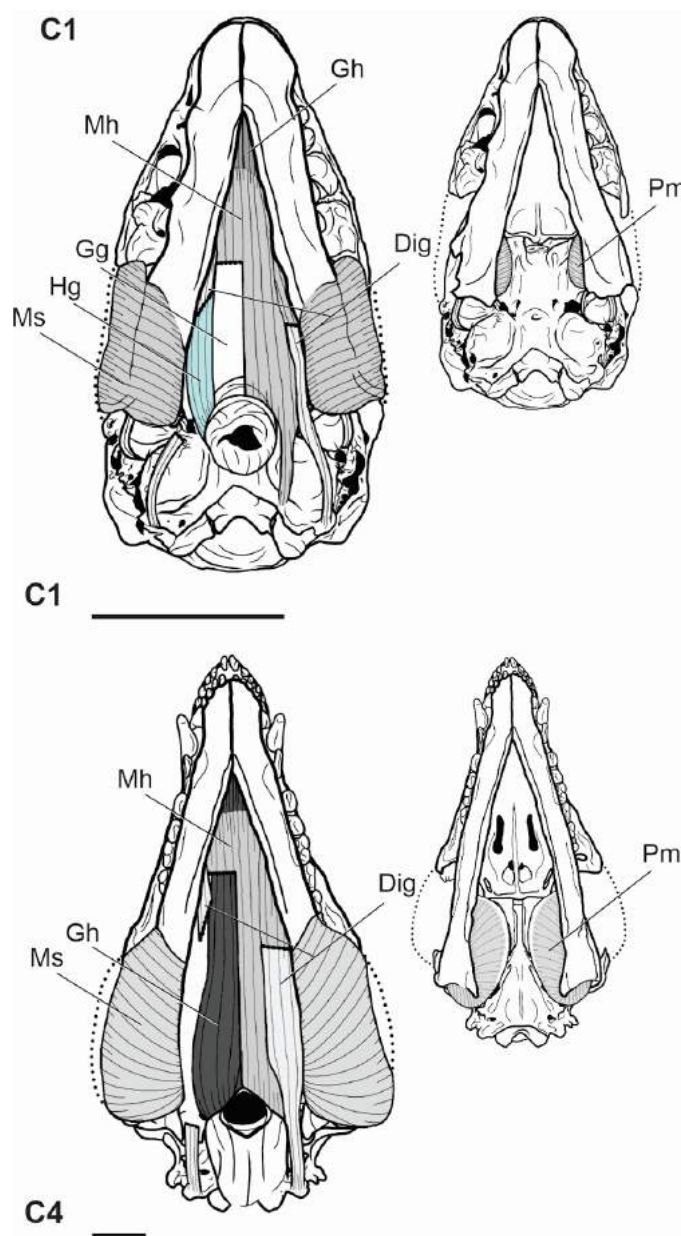
O *temporalis*, assim como o masseter, foi dividido em *pars superficialis* e *pars profunda*. Esses músculos se originam após a órbita e cobrem a parede lateral ao longo do desenvolvimento. O *temporalis pars superficialis* se inseriu lateralmente no processo coronóide (Ts; Figuras 2 e 4) e preencheu o espaço entre o ramo, masseter profundo e a superfície súpero-medial do arco zigomático. Em C1, embora

a fáscia cubra o crânio na altura da órbita, a massa do temporal superficial se concentra mais próxima de sua inserção, um pouco acima do posicionamento do processo coronóide, e se estendeu anteriormente até atrás da órbita e posteriormente a nível da raiz posterior do arco zigomático (C1-Ts; Figura 2). A orientação das fibras se modifica ao longo da sua extensão, de posteriormente orientadas para inclinadas anteriormente à medida que se aproxima da órbita. Esse componente de orientação anterior se manteve próximo da inserção nos estágios seguintes, enquanto as fibras sobre a parede do crânio foram mais posteriores (Ts; Figura 2). Em C2, a origem do *temporalis pars superficialis* se estendeu posteriormente no crânio e anteriormente sobre a margem pós-orbital (C2-Ts; Figura 2). A inserção no ramo mandibular também se estendeu inferiormente sobre o processo coronóide. O aumento da área de alojamento deste músculo na parede lateral do crânio e no ramo mandibular continua em C3 e C4 (Ts; Figuras 2 e 4). Esse músculo torna-se completamente massivo e aumenta sua área de fixação ao alcançar dorsocaudalmente a crista sagital e nugal do crânio nos estágios mais maduros. A extensão anterior acima da órbita permaneceu relativamente constante desde C2 e foi delimitado pelo processo pós-orbital em C3 e C4.

O *temporalis pars profunda* é coberto pela porção superficial e se insere no processo coronóide medialmente na mandíbula (Tp; Figura 4). Esse músculo ocupa a constrição pós-orbital e a variação desse caráter nos estágios iniciais determina uma morfologia particular. A ausência dessa constrição e a proximidade ao topo do processo coronóide na parede lateral do crânio em C1 não fornece espaço para o seu alojamento (C1; Figura 1). O temporal profundo nesses indivíduos se posicionou sobretudo anteriormente e posteriormente ao processo coronóide, em volta da sua borda (C1-Tp; Figura 2). Esses componentes, anterior e posterior, podem se unir numa pequena faixa de espaço possível abaixo do topo do processo coronóide, mas as fibras se inserem na mandíbula essencialmente por dois “cordões” musculares, respectivos aos componentes, que se unem medialmente um pouco abaixo do nível da linha dentária. O temporal profundo a partir de C2 abrangeu medialmente o processo coronóide e se estendeu sobre a fossa temporal com o desenvolvimento da constrição pós-orbital (C2-Tp; Figuras 2 e 4). Assim como a porção superficial, esse músculo também se estendeu dorsalmente e posteriormente no crânio até alcançar em C4 as cristas sagital e nugal, e anteriormente abaixo da margem do processo pós-orbital. As fibras neste estágio foram essencialmente orientadas

posteriormente embora as que se inserem mais rostralmente no processo coronóide possam um trajeto mais vertical. Essas fibras se orientam mais anteriormente nas classes antecessoras a C4 (Tp; Figura 2). A fixação do temporal profundo alcança a borda do processo coronóide em C2 e se estende para a borda lateral do processo em C3-C4, da base até o topo do processo coronóide coberto por uma aponeurose (Tp; Figura 2 e 4).

Figura 3. Músculos *masseter pars superficialis* (Ms), *digastricus* (Dig), *mylohyoideus* (Mh) e *geniohyoideus* (Gh), em visão ventral do crânio em indivíduos C1 e C4. O *geniohyoideus* foi claramente distinto somente em C4. Nos indivíduos C1, apenas o *hyoglossus* (Hg) e o *genioglossus* (Gg) foram identificados após a remoção do *mylohyoideus*.



Fonte: O autor (2023)

Pterygoideus medialis

A origem do *pterygoideus medialis* ou *internus* se estendeu posterolateralmente ao palatino, ao osso pterigoide e ao alisfenóide para se inserir medialmente sobre processo angular (Pm; Figuras 3 e 4). A fixação no crânio em C1 ainda alcançou o ectotimpânico. O alojamento se expandiu nas outras classes com a ampliação do osso pterigoide e desenvolvimento da constrição pós-orbital. A inserção deste músculo se posiciona acima da inserção do *masseter pars superficialis* e abaixo da inserção do *temporalis pars profunda* na mandíbula, e também se estendeu ao longo das classes (Pm, Figura 4). O *pterygoideus medialis* em C1 se inseriu sobre o processo angular e ocupou muito pouco do ramo da mandíbula. Nas classes seguintes, parte do músculo abrange o corpo mandibular e alcança abaixo do quarto molar em C4, com um tendão firme anexado a ponta do processo angular. O músculo é orientado anteriormente, mas adquiriu um relacionamento estrutural complexo. As fibras foram mais horizontais à medida que se estenderam na mandíbula, enquanto as trajetórias foram bem restritas em C1.

Digastricus

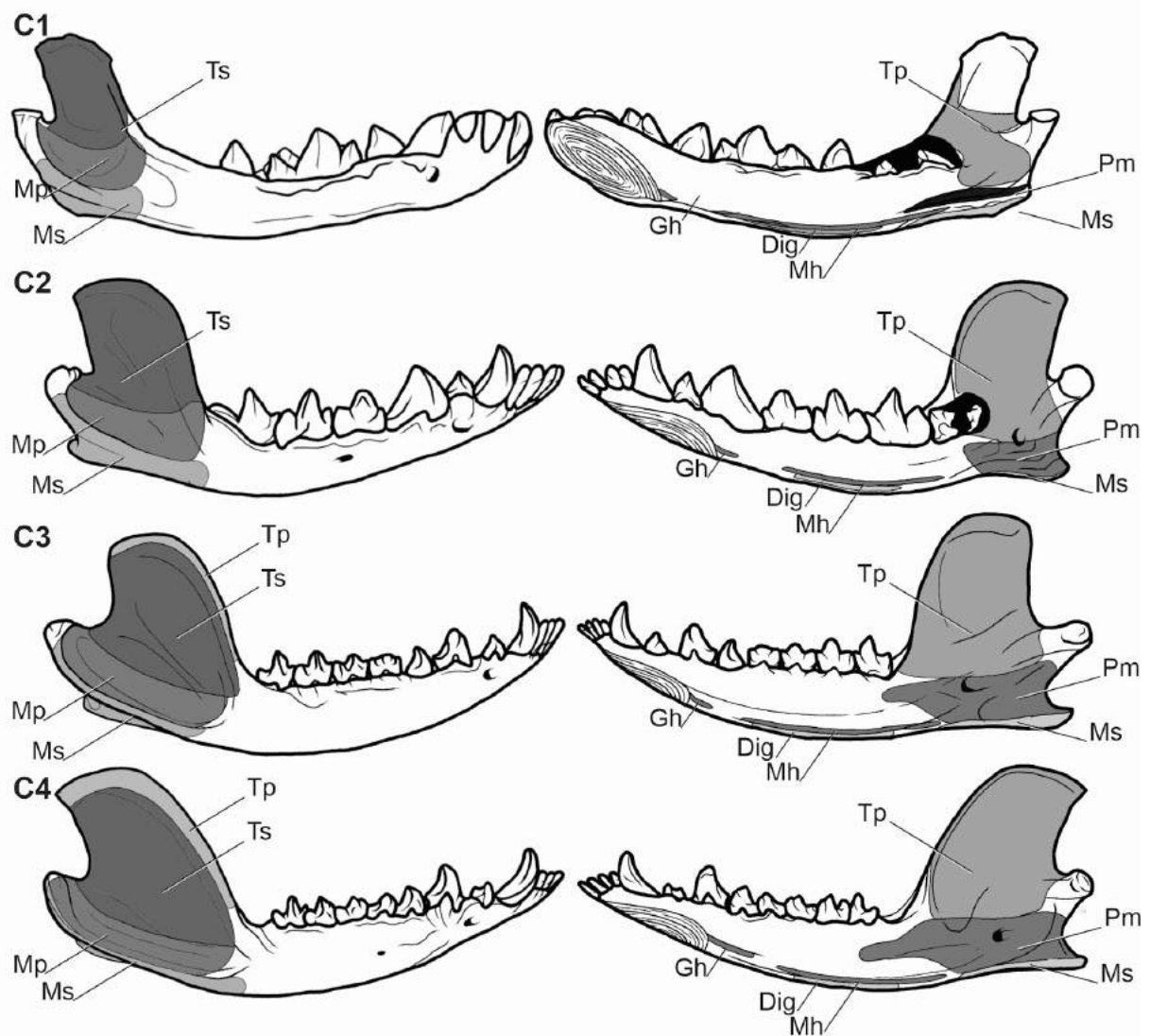
O *digastricus* é um músculo composto por dois ventres que parte posteriormente do crânio para se inserir na mandíbula (Dig; Figuras 2, 3 e 4). O ventre posterior se originou no processo paracondilar do exoccipital e se une ao aparato hioide. O processo está localizado logo abaixo dos côndilos e é menos distinto nos estágios iniciais, especialmente em C1 quando apresenta uma maior proximidade com o processo timpânico do petrosal. Ele é pequeno em C2 mas se estende ao longo do desenvolvimento. Essa mudança atua na morfologia do ventre posterior que se tornou mais volumoso embora tenha sido similar com o ventre anterior em C1. O ventre posterior ainda foi mais curto em relação ao anterior em C3 e C4. A divisão entre ele e o ventre anterior é pouco visível em C1 e C2 mas é possível identificar uma leve constrição em C3 e a aponeurose que liga o *digastricus* ao aparato hioide em C4; essa interação foi tendinosa em um dos indivíduos. Já o ventre anterior se originou no aparato hioide e se inseriu medialmente na mandíbula próximo da borda ventral, anterior ao *masseter pars superficialis* (Dig; Figuras 3 e 4). Além de interagir com o *masseter pars superficialis* em direção à sua fixação, esse

ventre cobre parcialmente o *mylohyoideus* que se posiciona logo acima. Essa cobertura é mais próxima da mandíbula em C1 e se estende medialmente nos estágios posteriores, mas sem que os ventres contralaterais se encostem na linha média. O ventre anterior foi mais largo e achatado em relação ao posterior a partir de C2. As fibras correram paralelamente de maneira similar entre os dois.

Mylohyoideus e Geniohyoideus

Assim como o *digastricus*, os músculos *mylohyoideus* e *geniohyoideus* também compõem o piso da cavidade oral. O *mylohyoideus* é um músculo bilateral que tem seus lados fundidos na linha mediana e recobre o *geniohyoideus* situado acima (Figura 3). Diferente dos outros músculos abordados anteriormente, tanto o *mylohyoideus* quanto o *geniohyoideus* se originam na mandíbula e se inserem no aparato hioide. A fixação do *mylohyoideus* no aparato é auxiliada pela fáscia que reveste o piso da cavidade oral. A origem se estende à frente da fixação do masseter e acima do *digastricus* no lado medial da mandíbula, mas não alcança a sínfise mandibular (Mh; Figura 4). Dessa forma, ele não preenche totalmente o espaço intermandibular, deixando visível a origem do *geniohyoideus* posicionado acima, imediatamente atrás da sínfise (Figura 3 e 4). Os *geniohyoideus* bilaterais também se fundem na linha média, e assim com o *mylohyoideus*, não possuiu uma rafe totalmente visível ao longo da sua extensão. Ele é representado por ventres volumosos que se inserem no hioide, logo acima do *mylohyoideus* (Gh; Figura 3), mas não foi identificado em todos os indivíduos. O *geniohyoideus* foi claramente distinto apenas em C4, enquanto nos estágios anteriores foi intimamente relacionado ao *mylohyoideus*, sobretudo em C1. É possível que o estado do crânio em C3, depositado no álcool, tenha influenciado a má identificação e a dissecação conjunta dos dois músculos, porém, foi consistente em C1 e C2 quando dissecando crânios frescos. A partir de C3 foi observado um acúmulo de fibras atrás da sínfise que se continua até o limite anterior do *mylohyoideus*. Os dois músculos apresentam fibras paralelas que se projetaram da origem para a inserção (Figura 3).

Figura 4. Áreas de fixação na mandíbula dos músculos dissecados. Abreviações dos músculos como nas figuras 2 e 3.



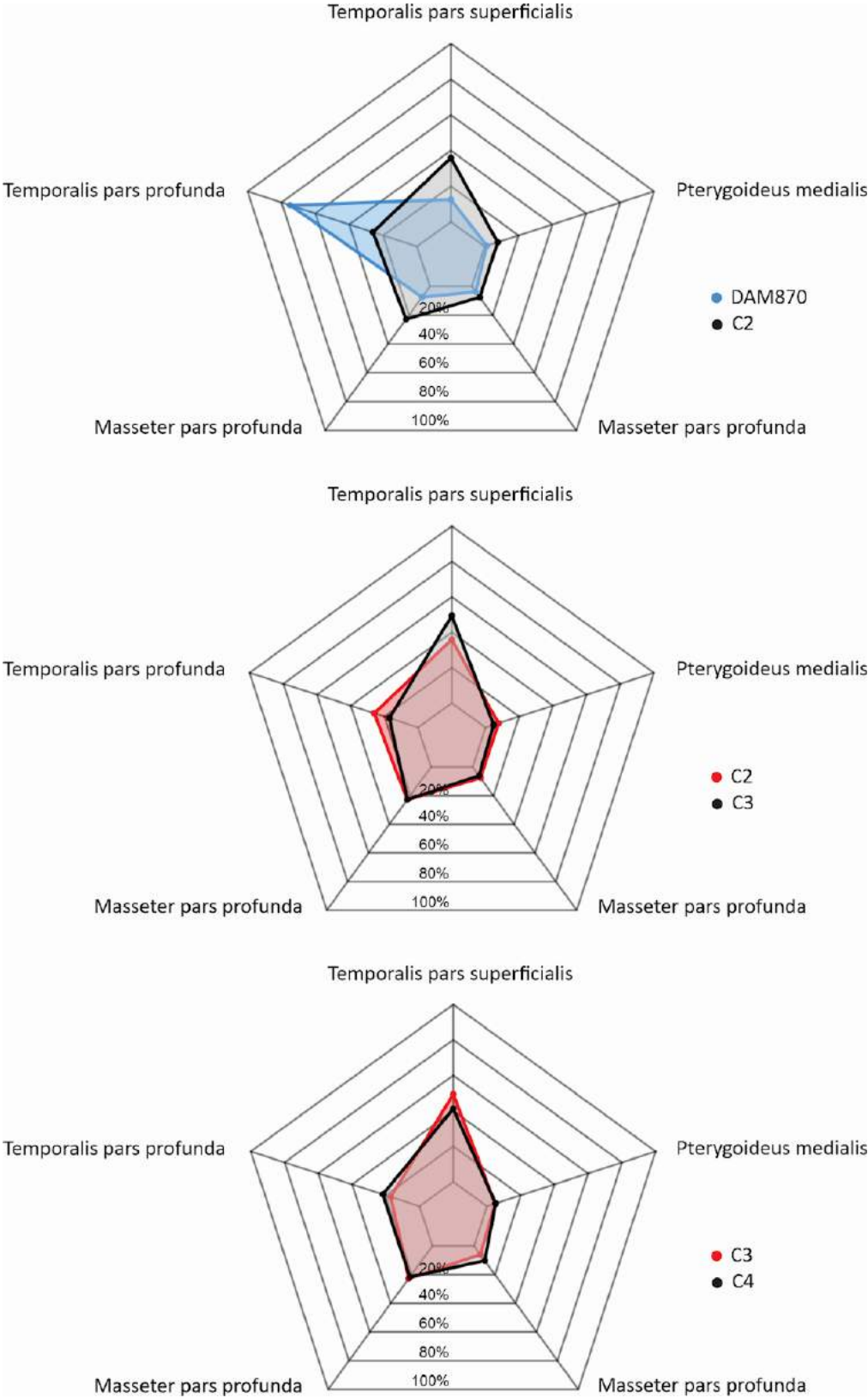
Fonte: O autor (2023)

3.3.2. Fração das massas musculares

A proporção ($\% \pm$ desvio padrão) dos músculos adutores apresentou um nível de semelhança de C2 à C4 com a dominância consistente do *temporalis pars superficialis*: *temporalis pars superficialis* (C2: $35.9 \pm 5.78\%$; C3: 49.37% ; C4: $41.15 \pm 3.53\%$), *temporalis pars profunda* (C2: $26 \pm 1.79\%$; C3: 17.02% ; C4: $21.75 \pm 6.22\%$), *masseter pars superficialis* (C2: $22.84 \pm 3.06\%$; C3: 22.69% ; C4: $21.65 \pm 1.54\%$), *masseter pars profunda* (C2: $7.6 \pm 2.11\%$; C3: 6.09% ; C4: $10.33 \pm 4.06\%$) e *pterygoideus medialis* (C2: $7.65 \pm 1.17\%$; C3: 4.83% ; C4: $5.12 \pm 4.06\%$) (Figura 5). No entanto, um dos indivíduos de C2 (DAM870, o menor espécime da amostra com a massa registrada de todos os músculos adutores) possuiu uma proporção muito diferente dos outros indivíduos do mesmo estágio. O *temporalis pars profunda* do

DAM870 representou 75% da massa adutora total seguido do *temporalis pars superficialis* (12.5%), *masseter pars superficialis* (7.5%), *masseter pars profunda* (3.75%) e *pterygoideus medialis* (1.25%) (Figura 5). A massa do *digastricus* e *mylohyoideus* mais *geniohyoideus* aumentou entre C2-C3 e tendeu a reduzir entre C3-C4 em relação a massa adutora total; DAM870: 1.25% e 2.5%, C2: $2.32 \pm 0.07\%$ e $10.33 \pm 7.89\%$, C3: 3.36% e 12.81%, C4: $3.11 \pm 0.07\%$ e $9.96 \pm 7.89\%$.

Figura 5. Gráfico de radar da média percentual da massa dos músculos adutores da mandíbula (*temporalis*, *masseter* e *pterygoideus medialis*) dos indivíduos C2 à C4 que tiveram a massa de todos os músculos registrada. A proporção dos músculos é comparada com a do estágio anterior (C2, C2-C3, C3-C4). O menor espécime da amostra (DAM870), dos indivíduos C2, foi separado e relacionado aos restantes da classe.

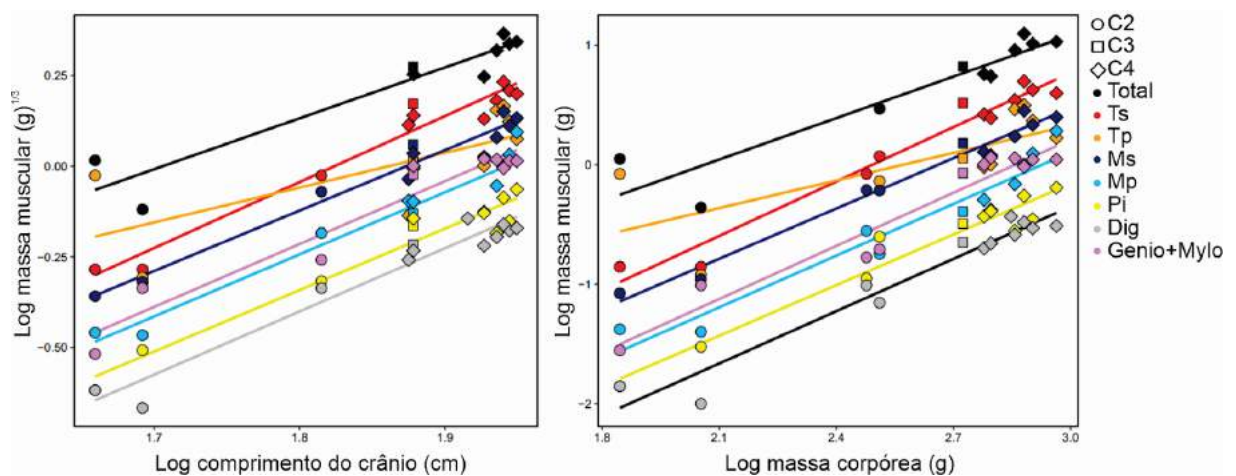


Fonte: O autor (2023)

3.3.3. Regressões

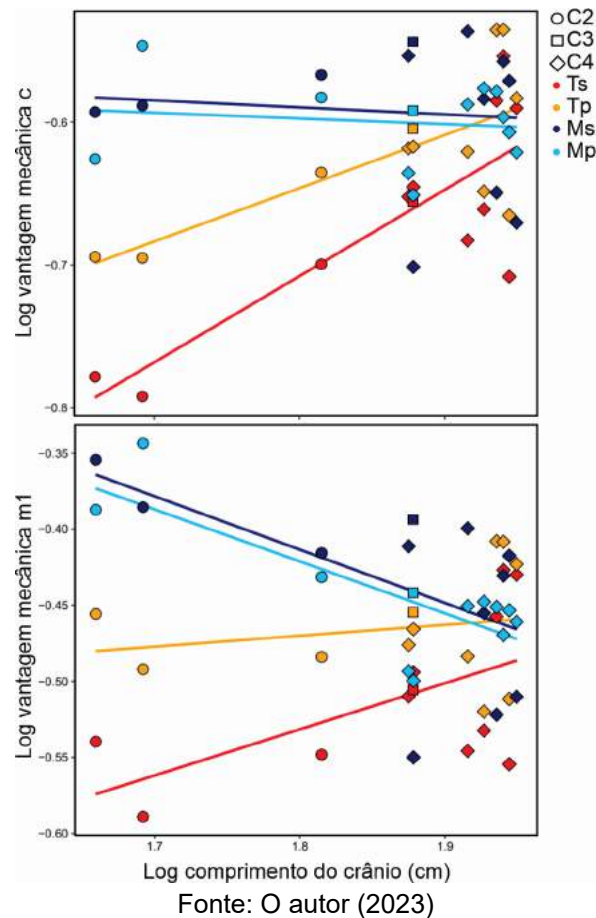
As massas musculares foram ao menos fortemente correlacionadas com os dois indicadores do tamanho ($p < 0.002$), com uma evidência moderada para o *temporalis pars profunda* ($p = 0.02$) (Tabela 2). Tanto o tamanho do crânio quanto a massa corpórea foram bons preditores para as massas musculares. A conformidade dos resultados nos modelos com o comprimento do crânio e uma variável mais independente do aparato mastigatório (*i.e.* massa corpórea), corrobora o padrão de crescimento dos músculos essencialmente por alometria positiva, com exceção do *temporalis pars profunda* e a massa adutora total que foram isométricos (Figura 6; Tabela 2). O *masseter pars profunda* foi isométrico apenas com a massa corpórea, com uma evidência moderada de alometria positiva (99.8% I.C.: 1.09-1.9, $t = 3.75$), assim como a massa adutora total com o comprimento do crânio (99.8% I.C.: 0.92-2.04, $t = 2.67$). Já as relações entre a vantagem mecânica dos principais adutores e comprimento do crânio não foram evidentes para todos os músculos (molar 1: *temporalis pars profunda*, *masseter pars superficialis*; canino: *masseter pars superficialis*, *masseter pars profunda*, $p > 0.05$) (Tabela 2). Somente a vantagem mecânica do *temporalis pars superficialis* para o canino foi significativamente relacionada com o comprimento do crânio ($p = 0.001$), enquanto o *temporalis pars superficialis* e *masseter pars profunda* para o molar 1, e o *temporalis pars profunda* para o canino apresentaram evidência moderada ($0.05 > p > 0.002$). Todos esses cresceram com alometria negativa, exceto *temporalis pars superficialis* para o canino que foi isométrico (Figura 7; Tabela 2).

Figura 6. Regressões das massas musculares com o comprimento do crânio e a massa corpórea. Abreviações dos músculos como nas figuras 2 e 3.



Fonte: O autor (2023)

Figura 7. Regressões da vantagem mecânica do temporalis e *masseter*, para a mordida no canino e primeiro molar, com o comprimento do crânio. Abreviações dos músculos como na figura 2.



3.4. Discussão

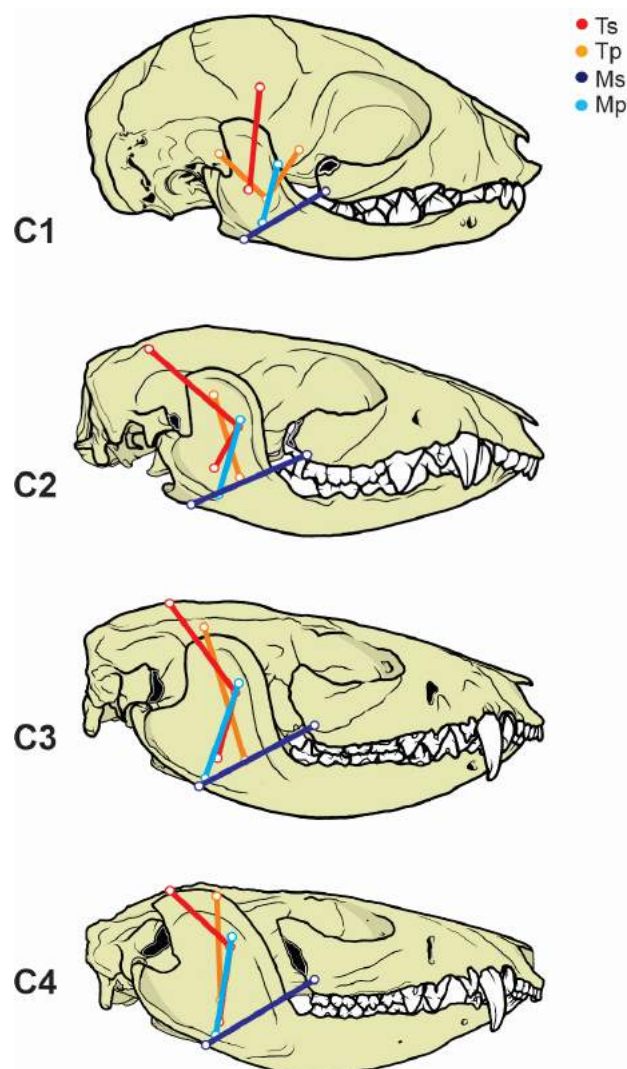
Apesar da maioria dos estudos miológicos do aparato mastigatório de marsupiais didelfídeos se concentrar no gênero *Didelphis* (COUES, 1872; DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; HIIEMAE; JENKINS, 1969; MINKOFF et al., 1979; TURNBULL, 1970; DIEGO et al., 2016), esse é o primeiro estudo a investigar qualitativamente e quantitativamente o desenvolvimento das características anatômicas ao longo da ontogenia pós-natal. Nossa descrição para os indivíduos C3 e C4 foi em geral similar às descrições prévias com o gênero. A anatomia dos músculos variou principalmente estendendo as áreas de fixação no crânio e mandíbula ao longo do desenvolvimento, especialmente a musculatura adutora (Figura 2, 3 e 4), porém a complexidade (*i.e.* número de músculos; DIOGO et al., 2016) continuou a mesma. Desta forma, não observamos outras camadas além das *pars superficialis* e *pars profunda* do *temporalis* e *masseter*, o que difere da descrição de Turnbull (1970) para a espécie congênica *D. marsupialis*. Turnbull

(1970) reconheceu o *m. zygomaticomandibularis* em *D. marsupialis*, assim como Deguchi, Takemura e Suwa (2001). As diferenças observadas entre *D. marsupialis* e *D. albiventris* pode ser devido a variações interespecíficas ou entre as dissecções. Entretanto, Turnbull (1970) afirma que o *zygomaticomandibularis* se origina na superfície medial do arco zigomático, com uma orientação mais vertical das fibras que o *masseter pars profunda*, mas também menciona que o músculo não foi claramente distinto das camadas mais profundas do masseter, e intimamente unido com o *temporalis* (ver também HIIEMAE; JENKINS, 1969). Esse último aspecto corrobora com a descrição de Diogo et al. (2016) que não identificou o *zygomaticomandibularis* como um músculo individual em *Didelphis virginiana*, mas como um feixe de fibras unidas ao masseter e parcialmente ao *temporalis*, que reconhecemos na orientação mais anterior das fibras próximas da inserção da sua porção superficial. Finalmente, a ausência do *zygomaticomandibularis* em *D. albiventris* é corroborada por Delupi, Carrera e Bianchini (1997) que não apontam o *zygomaticomandibularis* como parte da musculatura craniana da espécie.

Mesmo que a separação do *zygomaticomandibularis* das outras camadas do masseter possa ser arbitrária e artificial (HIIEMAE; JENKINS, 1969), a mudança geral na orientação das fibras, ainda com uma maior proximidade com o *masseter* em vez do restante do *temporalis*, facilita a distinção já que poderia inferir uma ação distinta entre as partes (HIIEMAE; HOUSTON, 1971). Entretanto, a continuidade das fibras do *masseter pars profunda* com parte da inserção do *temporalis pars superficialis* (DIOGO et al., 2016; HIIEMAE; JENKINS, 1969; TURNBULL, 1970) indica uma cadeia funcional (DAWSON; MILNE; Warburton, 2014) desse "bloco" adutor. Com isso, e baseado na uniformidade observada no estágio C2, consideramos uma segunda linha de ação para o *temporalis pars superficialis* (Figura 8) que agrupamos com a do *masseter pars profunda*. Esse agrupamento se justifica devido à proximidade entre as linhas de ação, das orientações de fibra e posição entre as partes adutoras. Neste contexto, nossa descrição se alinha à descrição funcional da musculatura adutora proposta por Hiiemae e Jenkins (1969) que a separa em três partes funcionais: i) adutor externo, que se origina da fáscia temporal, arco zigomático e fáscia massetérica, e se insere na superfície lateral do processo coronóide; ii) adutor interno, originado na parede lateral do crânio, anterior a junção temporomandibular, e se insere na superfície medial do processo coronóide; e iii) adutor posterior, com fibras que partem do crânio para se inserir na

borda posterior do processo coronóide. Ainda que com algumas diferenças, nossos resultados convergem com essa descrição geral. Também reconhecemos três partes adutoras em *D. albiventris*, representados pelo *masseter pars profunda* e as fibras do *temporalis pars superficialis* que partem do arco zigomático para se inserir lateralmente na mandíbula (adutor externo), pelo temporal profundo (adutor interno) e das fibras do temporal superficial que se originam no crânio e convergem mais ao topo do processo coronóide (adutor posterior).

Figura 8. Linhas de ação estimadas do *temporalis, pars superficialis* (vermelho) e *pars profunda* (laranja); e *masseter, pars superficialis* (azul escuro) e *pars profunda* (azul claro), de representantes dos estágios C1 à C4.



Fonte: O autor (2023)

Quando aplicamos essa mesma abordagem nos indivíduos C1, o componente posterior da linha de ação do *temporalis pars superficialis* é limitado e o temporal

profundo divide sua ação em dois componentes, um mais anterior e outro posterior (Figura 8). A adução parece ser minimizada quando aliada ao *masseter pars superficialis*, que representa uma fina camada muscular, e o *pterygoideus medialis* que aparentemente limita a abdução da mandíbula. A redução do movimento mandibular neste estágio não é surpreendente já que a língua exerce a principal atividade no aparato para o bombeamento do leite materno (FILAN, 1991; GERMAN; CROMPTON, 1996, 2000; HERRING, 1985), enquanto os músculos mastigatórios atuam mais tarde na ontogenia (BRASSARD et al., 2020a; CAMPBELL-MALONE et al., 2011). German e Crompton (1996) destacam o movimento mínimo da mandíbula durante a amamentação de *D. virginiana*. O movimento da língua é principalmente dorsal/ventral nesses indivíduos (GERMAN; CROMPTON, 1996). O piso da cavidade oral também indica esse movimento, de modo que seus músculos têm sido associados à amamentação (GERMAN; CROMPTON, 1996; LANGENBACH; WEIJS, 1990). O *mylohyoideus* e *geniohyoideus* participam do piso da cavidade oral mas cresceram com alometria positiva em vez de negativa, como seria esperado para uma menor atuação desses músculos em indivíduos com algum nível de independência das mães, que deixam de sugar para beber (GERMAN; CROMPTON, 1996, 2000). Entretanto, mesmo que o *digastricus*, *mylohyoideus* e *geniohyoideus* sejam agrupados e mantenham uma função comum durante a deglutição, é provável que o *mylohyoideus* seja mais efetivo para a movimentação do piso da cavidade oral e elevação da língua (HILMAE; JENKINS, 1969). Já *digastricus* e *geniohyoideus* estão envolvidos na abertura mandibular (WEIJS; BRUGMAN; KLOK, 1987), importante para predação ou consumo de itens maiores que podem suprir os requerimentos energéticos do maior tamanho dos indivíduos adultos. Dessa forma, a alometria positiva da massa do *mylohyoideus* mais *geniohyoideus* pode ser devido ao *geniohyoideus*. O *mylohyoideus* pode apresentar um padrão de crescimento diferente, mais próximo da alometria negativa, mas os músculos não foram retirados individualmente em todos os espécimes para que fosse testado.

Em indivíduos C2, a adução é aprimorada inicialmente com o desenvolvimento do *temporalis pars profunda* (para adução interna) e depois com o *temporalis pars superficialis* (para adução posterior). O *temporalis pars superficialis* permaneceu dominante nos indivíduos C3 e C4. Ao longo desses estágios, em adição à suspensão da mandíbula, o aparato mastigatório aumenta a capacidade de aduzir contra uma resistência anterior, conforme o componente posterior das fibras

do *temporalis* se torna mais evidente. A produção de força posterior é uma necessidade observada nos mamíferos carnívoros (GREAVES, 1991) e a progressão dessa propriedade ao longo do desenvolvimento é importante para obtenção de presas maiores e mais duras. Por outro lado, o *masseter pars superficialis* inclui fibras mais anteriores, até horizontais, ao longo do crescimento. Essas fibras se opõem a adução posterior e podem atuar em conjunto com o *pterygoideus medialis* contralateral na mandíbula (HIIEMAE; JENKINS, 1969).

As orientações das fibras do *pterygoideus medialis* tendem a ser anteriores, assim como o *masseter*, mas atingem uma direção menos vertical ao plano frontal à medida que se expande no corpo da mandíbula. Essa diversidade na orientação das fibras pode contribuir para a assimetria do movimento da mandíbula no curso final da mastigação (*i.e. power stroke* ou fase de potência) de *Didelphis*; nesta fase, quando os dentes inferiores e superiores entram em contato entre si ou com a comida, o lado ativo da mandíbula é movido para cima e medialmente, e o lado de balanceio move para cima mas não lateral como seria esperado (CROMPTON; HIIEMAE, 1970). As fibras do *pterygoideus medialis* poderiam tracionar a borda inferior da mandíbula anteriormente e medialmente, induzindo uma rotação no próprio eixo da hemimandíbula em vez de toda a estrutura (HIIEMAE; JENKINS, 1969). Entretanto, o componente medial é reduzido nos estágios mais jovens. As fibras tendem a ser mais verticalmente alinhadas no processo angular inflexionado, o que pode favorecer a extensão do músculo durante a depressão da mandíbula (VINYARD; TAYLOR, 2010). Em contrapartida, a proximidade entre a origem do *pterygoideus medialis* e inserção no processo angular em C1 reduz a sua linha de ação. O músculo neste estágio parece estar atuando mais como um estabilizador da mandíbula, prevenindo sua abdução. É possível que a redução dos movimentos da mandíbula nos indivíduos C1, auxiliada pelo *pterygoideus medialis*, não seja uma deficiência da musculatura adutora, mas uma necessidade para evitar danos ao crânio provocados pela adução muscular, já que diferente do aparato oral que ossifica antes do nascimento, a ossificação da caixa craniana ocorre mais tardiamente em marsupiais e em Didelphidae (BENNETT; GOSWAMI, 2013; CLARK; SMITH, 1993; SMITH; KEYTE, 2020). Isso justificaria a presença da inflexão do processo angular, reduzindo a linha de ação do *pterygoideus medialis*, ao menos no início do desenvolvimento. Embora seja tentadora, essa hipótese requer ainda mais estudos, especialmente comparando o desenvolvimento com aqueles que não

possuem o processo angular inflexionado (e.g. *Caluromys*), mas a ontogenia pode ser chave para explicar essa característica (SÁNCHEZ-VILLAGRA; SMITH, 1997).

A alometria do tamanho muscular está de acordo com os padrões de crescimento descritos por Abdala, Flores e Giannini (2001) para *D. albiventris*, também utilizando o comprimento do crânio como indicador do tamanho nas análises bivariadas. O espaço para acomodação do *temporalis* no crânio é possibilitado pela alometria negativa da caixa craniana em combinação com a isometria do arco zigomático. A alometria positiva do processo coronóide também amplia a superfície para fixação do músculo na mandíbula. Esse padrão permite o aumento gradual do *temporalis* ao longo do desenvolvimento, mas foi diferencial para as *pars superficialis* e *pars profunda*. O crescimento do *temporalis pars profunda* foi isométrico, enquanto o do *temporalis pars superficiais* foi alométrico. A alometria positiva do *temporalis pars superficialis* pode ser devido ao desenvolvimento da crista sagital que aumenta a área de origem do músculo no crânio ao longo da ontogenia, enquanto a *pars profunda* é mais dependente da constrição pós-orbital. Embora ainda haja evidência moderada para a alometria positiva do *temporalis pars profunda*, o crescimento isométrico sugere a importância do músculo desde cedo no desmame (ver DAM870; Figura 5) à medida que o restante dos adutores apresenta um padrão alométrico positivo e consistente com a massa corpórea (exceto o *masseter pars profunda* que foi isométrico). Essa tendência positiva indica que indivíduos adultos possuem músculos relativamente maiores e provavelmente uma mordida mais forte, já que a força muscular (indicado pela área de secção fisiológica transversal; PCSA) escala com a massa muscular e o comprimento dos fascículos tende a se manter ou reduzir relativamente ao aumento do tamanho (ver o capítulo 1 para os padrões alométricos gerais da massa, comprimento dos fascículos e PCSA).

A força de mordida é uma função importante do aparato mastigatório porque está relacionada ao espectro de itens alimentares acessíveis ao consumo por um indivíduo (DICKINSON; HARTSTONE-ROSE, 2023; DUMONT et al., 2009; HERREL et al., 2001; KILTIE, 1984; LAW; YOUNG; MEHTA, 2016; STANCHAK; FAURE; SANTANA, 2023). Uma força de mordida maior nos adultos garante o consumo de itens mais difíceis mecanicamente, como observado por Cáceres (2002) que identificou diferenças na dieta entre classes etárias de *D. albiventris*. Contudo, Cáceres (2002) não observou diferenças significativas entre elas. Isso indica que

jovens de *D. albiventris* possuem uma dieta similar aos mais adultos, mas possuem músculos relativamente menores e uma massa adutora menor. Com isso, é esperada uma vantagem mecânica maior nesses indivíduos para compensar o aparato mastigatório mais deficiente (BINDER; VAN VALKENBURGH, 2000). As relações que demonstraram alguma evidência da relação entre a vantagem mecânica e o comprimento do crânio seguiram esse alinhamento e tenderam principalmente para a alometria negativa. Esse resultado diverge dos estudos de Thompson, Biknevicius e German (2003), La Croix et al. (2011) e Tanner et al. (2009), em que a vantagem mecânica escalonou com alometria positiva. A diferença pode ser devido a abordagem mais simples da força muscular, sem considerar a orientação dos músculos, usada nestes estudos.

A redução da vantagem mecânica com o crescimento corrobora que o aumento no tamanho muscular seja mais relevante (ou correlacionado) que a mecânica da mandíbula para produção da força de mordida (LA CROIX et al., 2011; LAW; YOUNG; MEHTA, 2016; STANCHAK; FAURE; SANTANA, 2023). Isso ocorre porque o crânio e a mandíbula em *D. albiventris* continuam a crescer, e com alometria positiva (ABDALA; FLORES; GIANNINI, 2001; FLORES; ABDALA; GIANNINI, 2010, 2022; FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2018, 2003), mesmo após a conclusão da eclosão da dentição, o que tende a aumentar o braço de alavanca para os pontos de mordida. Indivíduos adultos parecem compensar isso através do comportamento, quando posicionam o alimento nos dentes posteriores, que são mais vantajosos mecanicamente (GREAVES, 2012). O maior crescimento no comprimento da mandíbula pode favorecer a abertura da boca (proporcional à distância de qualquer ponto ao longo da mandíbula em relação ao côndilo; KILTIE, 1984) e velocidade para itens maiores e mais ágeis (aves e outros mamíferos; CÁCERES, 2002), acessando os dentes mais posteriores. Por outro lado, a abertura da boca é limitada nos mais jovens (SINGLETON, 2015), mesmo que possuam uma vantagem mecânica maior. Esses indivíduos devem precisar abrir mais a boca ou morder mais anteriormente (BINDER; VAN VALKENBURGH, 2000), como seria permitido pelo pré-molar funcional (VAN NIEVELT; SMITH, 2005). A adução do *temporalis* (dominante em C2) pode auxiliar em qualquer dos casos, já que é um músculo que consegue produzir mais força numa abertura maior da mandíbula (HERREL et al., 2008; LAW; YOUNG; MEHTA, 2016; THEXTON; HIIEMAE, 1975). No entanto, desde C2 não ocorrem mudanças marcadas na organização do aparato

mastigatório (Figura 5). A configuração dos músculos mandibulares amadurece cedo e cresce aumentando em tamanho, mas sem ajustes no padrão do crescimento geral (Figura 6). Enquanto isso parece assegurar uma certa performance nos mais jovens, pode também estar associado ao aparato menos especializado (LA CROIX et al., 2011) descrito por Turnbull (1970) para *Didelphis*. Isso levanta o questionamento se didelfídeos com um sistema mastigatório menos generalizado sejam conduzidos por um padrão de crescimento da forma do crânio que ocorre ainda mais cedo, resultando em diferentes padrões alométricos dos músculos mandibulares, como *Lutreolina* mostra uma massa adutora mais desenvolvida e a antecipação de características do crânio em relação a *D. albiventris* (DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; FLORES; GIANNINI; ABDALA, 2003). Para isso, a ontogenia pós-desmame dos músculos mastigatórios precisa ser mais bem investigada em Didelphidae, especialmente em didelfídeos com hábitos alimentares um pouco menos generalistas.

3.5. Conclusão

O aparato mastigatório dos mamíferos é influenciado principalmente pelos hábitos alimentares. Ao observar as mudanças ontogenéticas que envolvem esse aparato, compreendemos o desenvolvimento de traços morfofuncionais relacionados à dieta. Neste estudo, investigamos o desenvolvimento pós-natal de músculos mastigatórios e acessórios da mastigação. Coletamos informações e medições anatômicas para o desempenho mastigatório. Nós observamos que os músculos mastigatórios cresceram geralmente ampliando suas áreas de fixação no crânio e mandíbula. O *temporalis pars profunda* se desenvolveu mais cedo com a formação da constrição-pós orbital, provavelmente para elevação da mandíbula, seguido pelo *temporalis pars superficialis* que se tornou dominante logo após o desmame, adicionando a adução posterior nos estágios mais maduros. Os indivíduos mais velhos também apresentaram músculos relativamente maiores que os mais jovens, indicando uma capacidade de força de mordida maior para o consumo de presas grandes. O padrão geral de crescimento alométrico dos músculos mastigatórios associado com o arranjo que se desenvolve cedo na ontogenia, pode estar relacionado ao aparato mais generalizado descrito para *Didelphis*. Essas

informações fornecem um plano básico para comparação com outros didelfídeos, com tamanho e hábitos alimentares distintos.

3.6. Tabelas

Tabela 1. Espécimes usados no estudo.

ID	Classe	Sexo	Estado	MC (g)	CC (mm)	Ts (g)	Tp (g)	Ms (g)	Mp (g)	Pm (g)	Total (g)	Dig (g)	Mh+Gh
DAM845	C4	F	Fresco	704	82.34							0.37	
DAM866	C4		Álcool		74.97	1.57	0.28	0.56	0.37			0.12	
DAM869	C2		Álcool 70	300	65.31	0.6		0.44	0.2	0.08		0.07	0.12
DAM870	C2		Álcool 70	70	45.65	0.1	0.6	0.06	0.03	0.01	0.8	0.01	0.02
DAM873	C3	M	Álcool 70	530	75.51	2.35	0.81	1.08	0.29	0.23	4.76	0.16	0.61
DAM899	C2		Fresco	324		1.18	0.73	0.61	0.18	0.25	2.95	0.07	0.14
DAM891	C4	M	Fresco	800	87.94	4.24	2.34	2.16	1.245	0.35	10.335	0.295	0.79
DAM900	C4	F (Lac)	Álcool 70	920	88.97	2.84	1.2	1.79	1.37	0.46	7.66	0.22	0.79
DAM902	C4	M	Fresco	720	86.19	3.48	2.92	1.73	0.69	0.28	9.1	0.26	0.81
DAM903	C4	M	Fresco	760	87.13	5	3.15	2.84	1	0.55	12.54	0.33	0.69
DAM904	C4	F (Lac)	Fresco	600	75.55	2.64	0.96	1.28	0.51	0.37	5.76	0.2	0.72
DAM905	C4	F (Lac)	Fresco	625	84.49	2.47	1.01	1.2	0.42	0.41	5.51	0.22	0.82
DAM908	C2	M	Fresco	113	49.2	0.14	0.12	0.11	0.04	0.03	0.44	0.01	0.07
DAM872, DAM884, DAM882, DAM885, DAM887, DAM888, DAM889, DAM890, DAM892	C1		Fresco/ Álcool 70	5.1 - 22	21.92 - 32.26	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

ID: Identificação; MC: Massa corpórea; CC: Comprimento do crânio; Ts: *Temporalis pars superficialis*; Tp: *Temporalis pars profunda*; Ms: *Masseter pars superficialis*; Mp: *Masseter pars profunda*; Pm: *Pterygoideus medialis*; Dig: *Digastricus*; Mh+Gh: *Mylohyoideus* mais *geniohyoideus*; Lac: Lactante.

Fonte: O autor (2023)

Tabela 2. Estatística das regressões de principal eixo reduzido (RMA) das massas musculares e vantagem mecânica com o comprimento do crânio e massa corpórea. Todas as regressões foram realizadas no PAST com os valores logaritmizados. A massa foi linearizada ^{1/3} antes da análise com o comprimento do crânio. As células em negrito destacam p e t significativo (0.002) e o intervalo de confiança (C.I.) quando não incluiu a inclinação da reta esperada para isometria (= 1).

	Comprimento do crânio						Massa corpórea					
	b*	r	r ²	p	99.8% C.I.**	t	b*	r	r ²	p	99.8% C.I.**	t
Massas musculares												
<i>Temporalis pars superficialis</i>	1.86	0.98	0.96	<0.001	1.47 - 2.25	6.78	1.54	0.98	0.96	<0.001	1.24 - 1.84	5.61
<i>Temporalis pars profunda</i>	1.36	0.71	0.5	0.022	0.31 - 2.41	1.06	1.07	0.72	0.52	0.018	0.26 - 1.87	0.26
<i>Masseter pars superficialis</i>	1.7	0.98	0.96	<0.001	1.35 - 2.06	6.14	1.42	0.99	0.98	<0.001	1.19 - 1.65	5.73
<i>Masseter pars profunda</i>	1.78	0.96	0.93	<0.001	1.29 - 2.27	4.9	1.5	0.96	0.93	<0.001	1.09 - 1.90	3.75
<i>Pterygoideus medialis</i>	1.74	0.97	0.94	<0.001	1.30 - 2.19	5.15	1.45	0.97	0.95	<0.001	1.11 - 1.79	4.11
<i>Massa adutora total</i>	1.48	0.95	0.89	<0.001	0.92 - 2.04	2.67	1.24	0.93	0.87	<0.001	0.76 - 1.72	1.53
<i>Digastricus</i>	1.79	0.97	0.94	<0.001	1.38 - 2.21	5.94	1.5	0.97	0.94	<0.001	1.16 - 1.84	4.52
<i>Mylo- e geniohyoideus</i>	1.8	0.96	0.92	<0.001	1.27 - 2.34	4.62	1.53	0.97	0.94	<0.001	1.14 - 1.92	4.21
Vantagem mecânica molar 1												
<i>Temporalis pars superficialis</i>	0.36	0.58	0.34	0.047	(-0.09) - 0.81	-4.37						
<i>Temporalis pars profunda</i>	0.38	0.19	0.03	>0.05	0.01 - 0.74	-5.27						
<i>Masseter pars superficialis</i>	-0.61	-0.57	0.32	>0.05	(-1.11) - (-0.12)	-10.1						
<i>Masseter pars profunda</i>	-0.44	-0.78	0.61	0.0026	(-0.7) - (-0.17)	-16.67						
Vantagem mecânica canino												
<i>Temporalis pars superficialis</i>	0.74	0.82	0.67	0.001	0.32 - 1.15	-1.98						
<i>Temporalis pars profunda</i>	0.53	0.7	0.49	0.0116	0.16 - 0.91	-3.84						
<i>Masseter pars superficialis</i>	-0.54	-0.09	0.01	>0.05	(-1.06) - (-0.01)	-9.07						
<i>Masseter pars profunda</i>	-0.3	-0.13	0.02	>0.05	(-0.59) - (-0.01)	-13.86						

*inclinação; **Intervalo de confiança

Fonte: O autor (2023)

4. CAPÍTULO 3. Arquitetura Muscular Mastigatória e Implicações para a Dieta de Marsupiais Didelfídeos (Didelphimorphia; Didelphidae)

4.1. Introdução

A família Didelphidae (gambás e cuícas) abrange uma vasta diversidade de marsupiais americanos viventes da ordem Didelphimorphia. A família inclui quase 130 espécies que estão amplamente distribuídas na região Neotropical e ocorrem em diferentes habitats (VOSS; JANSÁ, 2021; ASTÚA; CHEREM; TETA, 2022). Didelfídeos podem ser terrícolas, arborícolas, fossoriais/semifossoriais ou semiaquáticos (FARIA; LANES; BONVICINO, 2019) e exibem características que suportam seu modo de vida. Espécies arborícolas, como dos gêneros *Marmosa* e *Caluromys*, possuem caudas preênses, dedos das mãos relativamente mais longos e membros anteriores de tamanhos mais similares que espécies terrícolas, como de *Metachirus* (ASTÚA, 2015; VOSS; JANSÁ, 2021). *Chironectes minimus*, de hábito semiaquático, se destaca como um caso excepcional que possui membranas interdigitais no pé, cauda levemente achatada e a capacidade de fechar a abertura do marsúpio durante o mergulho (FERNANDEZ et al., 2015). Entretanto, em relação à dieta, os didelfídeos são descritos como animais generalistas ou oportunistas (LESSA; CARVALHO; ASTÚA, 2022; VIEIRA; ASTÚA, 2003). As espécies mostram uma grande sobreposição dos itens consumidos ou podem variar sua dieta dependendo da sua disponibilidade e acessibilidade no ambiente (DE CARVALHO; PASSOS; LESSA, 2019; LEINER; SILVA, 2007; LESSA; GEISE, 2014; THIELEN et al., 1997). Esses animais se alimentam de flores, néctar, frutas, vermes, artrópodes e pequenos vertebrados (LESSA; CARVALHO; ASTÚA, 2022). A baixa seleção para uma dieta mais estrita parece associada a baixa diferenciação da forma do aparato mastigatório (CHEMISQUY et al., 2020), que se mantém conservado (ASTÚA, 2015b; DIOGO et al., 2016) e generalizado em relação a outros mamíferos (TURNBULL, 1970).

Estudos com o crânio e mandíbula de didelfídeos têm investigado a relação entre a morfologia e a dieta (ASTÚA DE MORAES, 1998; ASTÚA DE MORAES et al., 2000; CHEMISQUY et al., 2020; SILVA-NETO, PAVAN E ASTÚA, 2023). Apesar das similaridades morfológicas, Astúa de Moraes (1998) e Astúa de Moraes et al. (2000) observaram diferenças na forma craniana e mandibular que poderiam

corresponder as principais tendências de dieta representadas em Didelphidae, em direção a frugivoria (*Caluromys philander*), insetivoria (*Metachirus nudicaudatus*) e carnivoria (*Lutreolina crassicaudata*). *L. crassicaudata* apresentou um rostro curto, um estreitamento pronunciado na caixa craniana (aumento da fossa temporal) e o processo coronóide mais amplo que aponta adaptações para a carnivoria (*i.e.*, resistência a torção, vantagem mecânica aprimorada e músculo temporal bem desenvolvido). *Caluromys philander* também demonstrou um rostro mais curto, mas com a ampliação da caixa craniana. O espaço mais estreito para passagem do músculo *temporalis*, acompanhado pelo processo angular mais alto e a fossa massetérica desenvolvida, indicaria um músculo masseter relativamente maior que seria empregado no consumo de frutos. *M. nudicaudatus* não foi tão diferente quanto às espécies anteriores, mas apresentou um rostro mais comprido. Mandíbulas relativamente mais longas fecham mais rápido, o que seria relevante na captura de insetos. *Caluromys* também foram bem definidos no morfoespaço quando Silva-Neto, Pavan e Astúa (2023) analisaram as mandíbulas com uma amostra taxonomicamente mais ampla. A ampliação do processo coronóide de *Lutreolina* também foi notado, mas se sobrepôs a táxons onívoros e os insetívoros (incluindo *Metachirus*). A sobreposição entre os mais insetívoros e os mais carnívoros pode refletir o menor grau de diferenciação da dieta e/ou da seleção morfológica da forma para essa variação alimentar. Insetívoros teriam uma dieta mais próxima dos mais carnívoros (e vice-versa) que dos mais frugívoros. Nesse contexto, Vieira e Astúa de Moraes (2003) classificaram a dieta dos didelfídeos com base nesse contínuo de espécies essencialmente mais frugívoras e insetívoras, até as mais carnívoras. Chemisquy et al. (2020) usaram as classes para incluir a influência funcional da extensão da dieta na morfologia do crânio de didelfídeos. As espécies ranqueadas como I, III e V (de I, as mais frugívoras, à V, as mais carnívoras) ocuparam um morfoespaço diferente, mas que poderia ser explicado por outros fatores além da dieta, como a afinidade filogenética. Um exemplo disso são as diferenças detectadas na forma em *Caluromys*. Embora o gênero inclua espécies mais frugívoras de Didelphidae, também é filogeneticamente distante do restante dos didelfídeos (ASTÚA; CHEREM; TETA, 2022).

Achar uma correspondência entre a forma do aparato mastigatório dos didelfídeos e a dieta, se é que ela existe, tem sido desafiador, seja por limitações na quantificação da dieta ou nas inferências morfológicas que se concentram

principalmente na estrutura óssea. No entanto, o tecido mole tem demonstrado correlações funcionais com diferentes comportamentos em outros mamíferos, incluindo marsupiais (DAWSON; MILNE; Warburton, 2014; MORALES et al., 2018; Warburton, 2009; Warburton et al., 2013; Warburton; YAKOVLEFF; MALRIC, 2012). As proporções musculares variam quanto a função do aparato mastigatório (para cortar, moer ou roer; TURNBULL, 1970) e dieta. Mudanças na orientação, arranjo interno, tamanho e o grau de diferenciação de músculos funcionalmente associados, auxiliam nossa compreensão de uma possível evolução adaptativa e influências seletivas (HERRING, 1993). Informações da arquitetura muscular podem ser utilizadas para estimar fatores críticos de performance, como a extensão muscular, relacionada ao comprimento das fibras musculares, e a área de seção transversal fisiológica (PCSA; *physiological cross-sectional area*), proporcional a força muscular isométrica (GORNIK, 1985; HARTSTONE-ROSE et al., 2019; ABREU; GUILHON; ASTÚA, 2023). A troca arquitetural entre a extensão e produção de força muscular prediz o quanto os músculos mastigatórios estão adaptados funcionalmente para a abertura da boca, dado que estão anexados à mandíbula, e a força de mordida, estimada conforme a força muscular é transmitida para o local da mordida.

As relações de escala entre a massa muscular, o comprimento das fibras, a PCSA e a força de mordida em relação ao tamanho corpóreo são alvo de interesse (HARTSTONE-ROSE et al., 2018, 2022; HARTSTONE-ROSE; HERTZIG; DICKINSON, 2019; HARTSTONE-ROSE; PERRY; MORROW, 2012). Esses padrões de escala conduzem a diferenças na performance (PFALLER; GIGNAC; ERICKSON, 2011) que, quando não são explicadas pelo tamanho, podem se relacionar a fatores da dieta como o tamanho e resistência mecânica do alimento. Se o tamanho é o principal fator responsável pela variação dessas medidas de performance, os didelfídeos constituem um excelente modelo para estudo, já que a alometria desempenha um papel importante na evolução desse grupo. Análises de modularidade e integração morfológica têm mostrado que marsupiais apresentam um crânio altamente integrado (SHIRAI; MARROIG, 2010). Isso significa que os didelfídeos tendem a responder às pressões seletivas com mudanças no tamanho, como foi mostrado a forte correlação entre a alometria e a forma do crânio em Chemisquy et al. (2020). Entretanto, Silva-Neto, Pavan e Astúa (2023) não acharam um papel importante da alometria na diversidade morfológica da mandíbula de

didelfídeos. Dessa forma, não é claro se o tamanho ainda seria o principal condutor da variação da musculatura mastigatória se, assim como a mandíbula, possuem um compromisso maior com a performance mastigatória.

Apesar dos apontamentos que isso envolve (*i.e.*, se aspectos morfológicos e funcionais da arquitetura muscular variam com as proporções dos itens de dieta, ou alometria, ou não diferem em razão do generalismo do aparato), estudos sobre a anatomia mastigatória de didelfídeos são escassos e quase nenhum deles apresentam dados quantitativos (COUES, 1872; DELUPI; CARRERA; BIANCHINI, 1997; DIOGO et al., 2016; HIEMAE; JENKINS, 1969; MINKOFF et al., 1979; SIDEBOTHAM, 1885; TURNBULL, 1970). A maioria se concentra no gênero *Didelphis*. Sidebotham (1885) ainda descreveu o sistema muscular de *Chironectes*, mas foi pouco ilustrativo para os músculos da cabeça. A única análise comparativa que realizou disseções com exemplares de gêneros diferentes (*Lutreolina* e *Didelphis*) foi de Delupi, Carrera e Bianchini (1997). *Lutreolina* não apresentou grandes diferenças em relação a *Didelphis*, mas os autores observaram um maior desenvolvimento da massa muscular adutora que liga *Lutreolina* ao hábito mais carnívoro em relação a *Didelphis* que é onívoro. De maneira similar para outros didelfídeos, esperamos que aspectos da morfologia e desempenho muscular do aparato mastigatório reflitam a dieta.

O objetivo deste capítulo foi analisar o aparato mastigatório de didelfídeos quanto a padrões de variação na anatomia, arquitetura muscular, e relacionamentos funcionais para o desempenho do aparato e exploração dos recursos alimentares.

4.2. Metodologia

Nós dissecamos os músculos adutores da mandíbula de 15 espécimes representativos dos gêneros *Caluromys*, *Didelphis*, *Lutreolina*, *Philander*, *Metachirus*, *Marmosa*, *Marmosops* e *Monodelphis*. Também dissecamos um espécime adicional de *Chironectes minimus* que teve a cabeça parcialmente consumida por piranhas. Todos os indivíduos estavam depositados na Coleção de Mamíferos do Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais e na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Pernambuco. Todos eram adultos (exceto três juvenis: *Caluromys* UFMG8410, *Metachirus* UFMG8413 e o *Chironectes* UFMG8408) e não apresentaram danos óbvios na musculatura (com

exceção do exemplar de *Chironectes*, como mencionado) quando descongelados ou armazenados no etanol (70%) até a dissecação. Removemos os músculos sob um estereomicroscópio binocular e com os crânios e mandíbulas próximos da oclusão. Os locais de origem e inserção, e direções das fibras foram cuidadosamente inspecionados e registrados para o mapeamento das fixações musculares. Logo após a remoção, os músculos foram transferidos para o etanol (70%), depois secos e pesados com o auxílio de uma balança de precisão de 0.01g, ou 0.0001 quando necessário. Cada músculo foi submerso em solução aquosa de ácido sulfúrico (10%) e aquecido a 60°C numa chapa aquecedora até que o tecido conectivo entre os fascículos fosse dissolvido (geralmente 15min-1h), como foi sinalizado pelo desprendimento ou afrouxamento dos fascículos. Deixamos os músculos secarem e os transferimos para uma solução aquosa de glicerina (50%). Todo manuseio pós o ácido foi realizado cuidadosamente para evitar que as fibras fossem danificadas. 5-10 fascículos (representativos para o comprimento das fibras) foram selecionados aleatoriamente, fotografados e medidos digitalmente com o ImageJ 1.53k (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). A média dos comprimentos foi fornecida para cada músculo (ou porção muscular) e usada no cálculo da PCSA. Antes da estimativa, precisamos ajustar as massas musculares para os espécimes armazenados no álcool, utilizando um fator de correção de 1.69, conforme Leonard et al. (2022a). Os comprimentos dos fascículos não se modificam significativamente enquanto os músculos estão presos ao osso (LEONARD et al., 2022b), por isso nenhum ajuste foi aplicado. A PCSA foi estimada ao dividir o volume (com os valores corrigidos de massa e uma densidade de 1,06 g.cm⁻³; LEONARD et al., 2021; MENDEZ; KEYS, 1960) pelo comprimento médio dos fascículos. As medidas corresponderam a músculos de um dos lados da cabeça. O outro apenas foi dissecado quando houve dano durante a dissecação ou devido a ação excessiva do ácido.

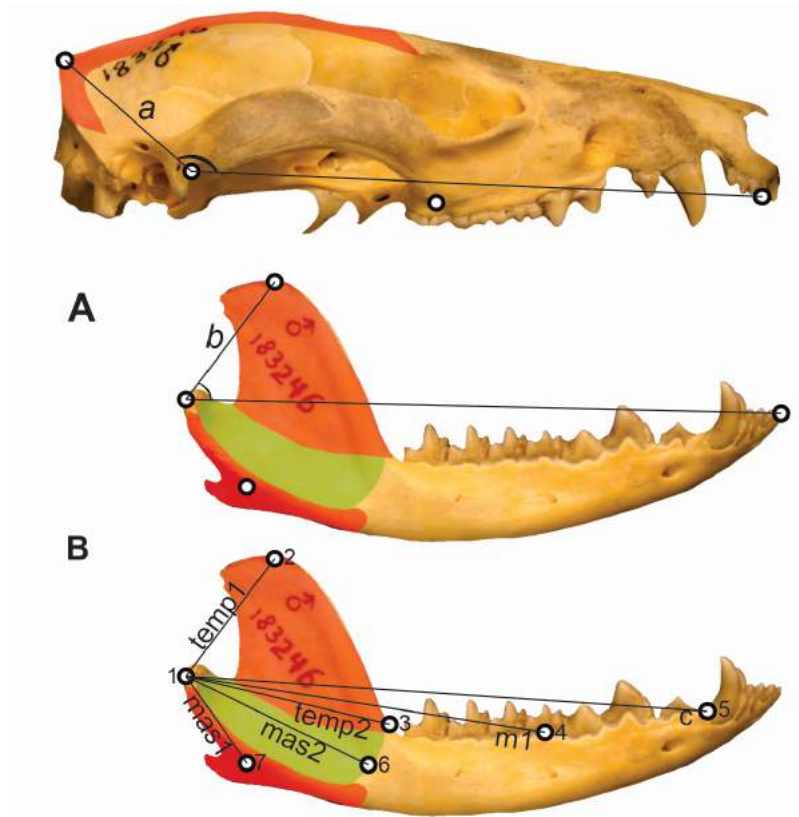
Usamos um modelo de alavanca bidimensional para estimar a força de mordida; os músculos atuam ao longo de uma barra rígida (mandíbula) entre a articulação e os dentes, onde se posiciona uma resistência (e.g. comida) (GREAVES, 2012). A tendência de rotacionar uma alavanca é denominada de momento e é um produto da força e sua distância perpendicular ao eixo, também chamada de braço de momento ou de alavanca. As duas forças que geram momento para rotação da mandíbula são a força muscular e a força de reação no

ponto de mordida (ou de reação da comida; HERREL et al., 1998, 2008). O vetor da força de mordida é oposto ao da força de reação da comida e igual em magnitude (BRASSARD et al., 2020a). Calculamos a força ao somar os momentos dos músculos individuais ($\sum \vec{M}_{\text{músculos}}$) e da força de mordida ($\vec{M}_{\text{mordida}}$) de um lado com a mandíbula em equilíbrio (somatório igual a zero). O momento das forças musculares foi determinado pela PCSA escalada a uma tensão muscular constante de 31 N/cm² (próximo da média descrita para *Didelphis virginiana*; THOMASON et al., 1990), e com o braço do momento igual a distância perpendicular da articulação temporomandibular ao vetor entre os centróides das áreas de fixação do músculo no crânio e mandíbula. O braço do momento da força de mordida foi medido ao vetor da força de reação da comida. Intersectamos o vetor da força a um ângulo de 90° relativo ao eixo que conecta a articulação e a ponta dos incisivos mais anteriores. A força de mordida foi calculada em dois pontos da linha dentária, no canino e primeiro molar. Não consideramos a mordida bilateral já que didelfídeos mostram movimentos independentes das hemimandíbulas e mordem unilateralmente (BHULLAR et al., 2019; CROMPTON, 1981). As áreas centróides e braços de momento foram estimados no ImageJ de fotografias laterais do crânio e mandíbula articulados dos mesmos espécimes.

A relação entre os braços de alavanca (da força muscular e de mordida) fornece uma estimativa do quão eficiente a força muscular é transmitida para o ponto de mordida. Calculamos a vantagem mecânica em conspecíficos das espécies dissecadas. A amostra compreendeu 342 fotografias da mandíbula de *Didelphis albiventris* (58), *Lutreolina crassicaudata* (54), *Philander quica* (55), *Metachirus myosurus* (54), *Marmosa murina* (51) e *Chironectes minimus* (70), depositados na Universidade Federal de Santa Catarina, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Museu Nacional, Museum of Vertebrate Zoology, Zoology Museum, Oklahoma Museum of Natural History, American Museum of Natural History, National Museum of Natural History, Field Museum of Natural History, KU Natural History Museum; as espécies dos gêneros *Caluromys*, *Marmosops* e *Monodelphis* não foram identificadas para inclusão. As mandíbulas foram fotografadas em visão lateral e usadas em um modelo simples de alavanca. Computamos os braços de alavanca de um conjunto de marcos anatômicos posicionados com o TpsDig 2.32 no ponto médio do côndilo (1), extremidade dorsal processo coronóide (2), base do processo

coronóide (3), alvéolo do primeiro molar (4), extremidade posterior do alvéolo do canino (5), ponto de inserção do masseter mais anterior na fossa massetérica (6) e ponto médio entre a raiz anterior e posterior do processo angular (7) da mandíbula (Figura 1). Os marcos indicam as extensões das fixações musculares dos principais adutores ao longo da mandíbula. Os braços musculares foram medidos como a distância linear entre o côndilo e os marcos 2 e 3, para o *m. temporalis* (*pars superficialis*, temp1; e *pars profunda*, temp2), e entre o côndilo e os marcos 6 e 7 para o *m. masseter* (*pars superficialis*, mas1; e *pars profunda*, mas2). A distância linear entre o côndilo e os marcos 5 e 4 representaram os braços de mordida no canino e primeiro molar (Figura 1). Todas as medidas foram realizadas com a função *interlmkdist* do pacote *geomorph* (ADAMS; OTÁROLA-CASTILLO, 2013) no R. Essa abordagem dos braços de alavanca é mais simples que a usada no cálculo da força de mordida pois não seria possível medir as distâncias perpendiculares à linha de ação, que conecta as áreas de fixação, sem que os crânios e mandíbulas fossem fotografados articulados. As fotografias também limitaram as observações no plano sagital (COX et al., 2020). Isso tornou inviável abordar a vantagem mais na extremidade do processo angular que é inflexionado nesses indivíduos. Apesar dessas simplificações que devem conduzir a alguma cautela, o modelo é aplicado de maneira consistente através de diferentes táxons de mamíferos (COX et al., 2020; LA CROIX et al., 2011; FABRE et al., 2017; MISSAGIA et al., 2021; PENROSE et al., 2020; TANNER et al., 2009).

Figura 1. Representação dos marcos de referência para as medições no crânio e mandíbula do fator de extensão (representado para o *temporalis*) (A) e na mandíbula para a vantagem mecânica (B).



Fonte: O autor (2023)

A mesma base de fotografias da mandíbula foi usada para verificar o quanto um músculo precisaria ser estendido para atingir uma determinada abertura de boca. Herring e Herring (1974) quantificam o efeito (fator de extensão) através de um modelo matemático que relaciona o comprimento de um músculo com a mandíbula em oclusão (I) e estendido com a rotação da mandíbula (L). Adaptamos as medidas para que o método fosse aplicado em imagens do crânio e mandíbula sem que estivesse em oclusão. As fotografias do crânio também foram tiradas em visão lateral e corresponderam às mandíbulas dos mesmos indivíduos. A amostra compreendeu 332 espécimes de *Didelphis albiventris* (57), *Lutreolina crassicaudata* (51), *Philander quica* (54), *Metachirus myosurus* (49), *Marmosa murina* (50) e *Chironectes minimus* (71). Usamos um eixo de referência no crânio e mandíbula para medir as variáveis. O eixo, que indicou uma linha de oclusão, conectou a articulação (no ponto médio da cavidade glenóide no crânio e do côndilo na mandíbula) e a ponta dos incisivos 2º superior e 1º inferior. Medimos as distâncias entre o côndilo e os locais de origem no crânio (a) e de inserção na mandíbula (b) das porções superficiais do *temporalis* e *masseter* que tendem a ser mais provocadas durante a excursão muscular, como indicado por comprimentos

diferenciais dos fascículos mais superficiais (ABREU; GUILHON; ASTÚA, 2023; KIKUCHI; KURAOKA, 2014; MARTIN et al., 2019). Os comprimentos de a e b foram medidos novamente com *interlmkdist*. O ângulo formado entre a e o eixo no crânio, e b e o eixo na mandíbula, foram registrados no TpsDig e subtraídos para estimar o ângulo entre a e b ($= \Phi$) quando a mandíbula está fechada. A abertura da boca foi simulada com uma excursão da mandíbula de 30° ($= \theta$), que é mencionada dentro da máxima abertura de boca durante o ciclo mastigatório dos gambás (WEIJS, 1994b). O novo ângulo formado entre a e b é indicado pela soma dos ângulos ($\theta + \Phi$). O modelo considerou apenas o movimento de rotação da mandíbula e é calculado como segue:

$$\left(\frac{L}{l}\right)^2 = \frac{a^2 + b^2 - 2 \times a \times b \times \cos(\varphi + \theta)}{a^2 + b^2 - 2 \times a \times b \times \cos(\varphi)}$$

Todos os dados foram linearizados quando necessário (tirados a raiz cúbica de variáveis volumétricas e quadrada quando de área) e logaritimizados. Os padrões alométricos de todas as variáveis foram analisados utilizando o tamanho do crânio como indicador de tamanho, já que não havia informações de massa corpórea para a maioria dos indivíduos dissecados. Realizamos uma análise de regressão de eixo principal reduzido da massa, comprimento médio dos fascículos e PCSA dos principais grupos adutores (*temporalis*, *masseter* e *pterygoideus medialis*) e de toda a musculatura adutora; e das forças de mordida no primeiro molar e canino, com o comprimento do crânio. A massa e PCSA dos grupos adutores e total foram obtidas somando os valores individuais dos músculos. Já o comprimento médio dos fascículos, considerando mais de um músculo, foi calculado através de uma média ponderada com o comprimento médio e as massas individuais (HARTSTONE-ROSE et al., 2022). A vantagem mecânica e o fator de extensão também foram escalonados com o comprimento do crânio. Os dois foram ajustados num modelo linear não paramétrico de Theil-Sem. Também testamos a correlação dessas variáveis com o tamanho usando a correlação de Spearman.

A vantagem mecânica, o fator de extensão e os resíduos das regressões com as forças de mordida foram analisados relativos à dieta. Inicialmente, ranqueamos as espécies nas cinco classes identificadas por Vieira e Astúa de Moraes (2003), recentemente atualizado por Lessa et al. (2022), desde as mais frugívoras (I, *Caluromys*; II, *Marmosa*), as generalistas (III, *Didelphis*) e as mais carnívoras (IV, *Metachirus*, *Monodelphis*, *Marmosops*, *Philander*; V, *Lutreolina*, *Chironectes*). Vale

ressaltar que esse espectro não representa categorias alimentares estritas em Didelphidae, mas sim um contínuo que demonstra alguma sobreposição em relação às classificações discretas (SILVA-NETO; PAVAN; ASTÚA, 2023; LESSA et al., 2022). Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para comparar a vantagem mecânica e o fator de extensão entre as classes, e o teste de Dunn para identificar as diferenças significativas entre elas. Os resíduos da força de mordida, que correspondem aos valores de força corrigidas pelo tamanho, foram comparados com o Anova.

Além de categorias discretas, a dieta também foi abordada como uma variável contínua para as propriedades mecânicas e as forças de mordida. Usamos essas propriedades para separar os alimentos nos tipos duro (e.g. ossos, alguns insetos), macio (e.g. tecido mole animal, alguns insetos), fibroso (e.g. pele de frutas) e túrgido (e.g. frutas suculentas, larvas de insetos) baseado em Lucas e Luke (1984), e Sibbing (1991). Informações adicionais da dureza dos alimentos auxiliaram na identificação desses itens, como a separação dos insetos ou frutas em duros e macios (VAN CAKENBERGHE; HERREL; AGUIRRE, 2002; VERWAIJEN; VAN DAMME; HERREL, 2002). Os itens consumidos e sua frequência relativa foram revisados de trabalhos com a dieta dos gêneros dissecados: Andrade (2017); Busch e Kravetz (1991); Cáceres (2002, 2004); Carvalho et al. (2005); Casella e Cáceres (2006); Castilheiro e dos Santos Filho (2013); Kuhnen et al. (2017); Leiner e Silva (2007); Lessa e da Costa (2010); Lessa e Geise (2014); Macedo et al. (2010); Parreira Claro e Hannibal (2022); Santori et al. (1997). A frequência de cada item foi determinada com a média ponderada (com o tamanho da amostra) entre os estudos. Invertebrados e frutos não identificados, não foram contabilizados. A fração dos itens duros foi usada para determinar o grau de dureza/desafio mecânico da dieta em cada gênero. Aplicamos a correlação de Pearson para testar a correlação deste índice com a média dos resíduos das regressões com as forças de mordida obtidas para os táxons.

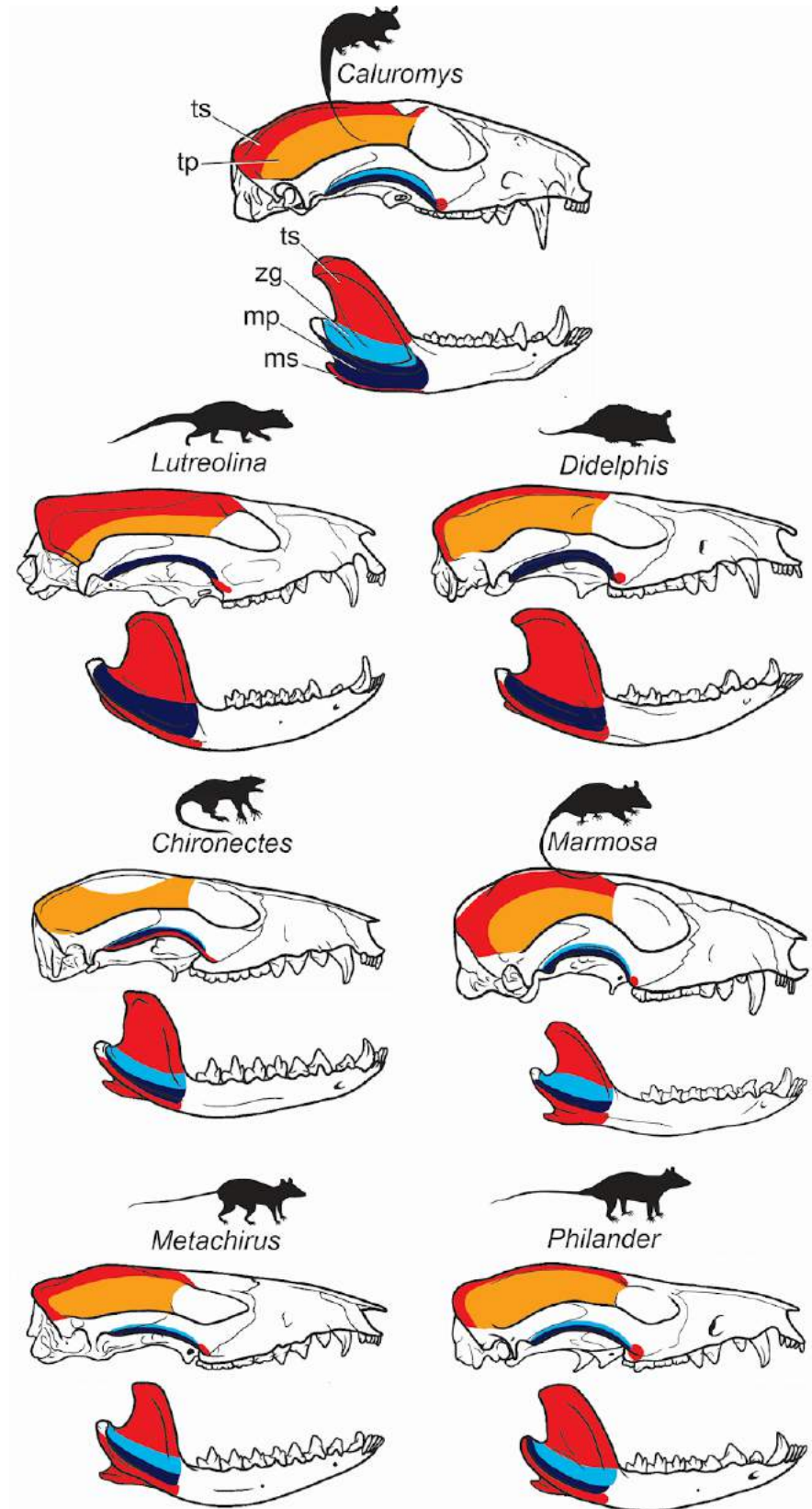
As regressões de eixo principal reduzido foram conduzidas no PAST 4.03, mas todas as análises restantes foram realizadas no RStudio 4.1.3 (RSTUDIO TEAM, 2020) através das funções básicas do R e os pacotes *lmtest*, *rstatix* e *mblm*. Consideramos o nível de significância igual a 0.001 e evidência moderada para p entre 0.001-0.05 (MUFF et al., 2022). Os desvios da isometria foram indicados pelo intervalo de confiança 99.9%.

4.3. Resultados

4.3.1 Descrição anatômica

As áreas de fixação laterais dos músculos estão mapeadas na figura 2.

Figura 2. Áreas de fixação dos músculos adutores no crânio e mandíbula em visão lateral. Ts, *temporalis pars superficialis*; tp, *temporalis pars profunda*, Ms, *masseter pars superficialis*; mp, *masseter pars profunda*; zg, *zigomaticomandibularis*. (Silhuetas por Milena Cavalcanti, Patricia Pilatti e Diego Astúa; Sarah Werning; e C. Camilo Julián-Caballero, em www.phylopic.org).



Fonte: O autor (2023)

Masseter

O masseter variou entre 2-3 porções: *pars superficialis* e *pars profunda*, consistente em todos os indivíduos dissecados, mais o *zygomaticomandibularis* (considerado como uma camada distinta da porção profunda), quando as três foram distintas. O *masseter pars superficialis* se originou com um tendão fixado posteriormente na maxila, acima dos últimos molares superiores, e se inseriu no processo angular da mandíbula. A origem corresponde a uma proeminência na maxila, marcada por um tendão forte e robusto. Algumas fibras se estenderam mais anteriormente em *Didelphis*, *Philander* e *Lutreolina*, próximo ou sobre o *m. levator labii superiores*, e eventualmente um pouco mais posteriormente sobre raiz anterior do arco zigomático em *Lutreolina* e *Metachirus*. Particularmente em *Chironectes*, o *masseter pars superficialis* se originou ao longo da face lateral do arco zigomático. As fibras neste exemplar foram mais verticais que nas outras espécies quando partem para trás e baixo para inserir no processo angular. Quanto mais posterior for a inserção, menor o ângulo do trajeto das fibras que tendem a ser mais horizontais. Essa característica da angulação das fibras é menos proeminente em *Caluromys*. Diferente dos outros gêneros, o processo angular nesses indivíduos não é inflexionado. O ventre do *masseter pars superficialis* tendeu a se posicionar mais inferiormente com fibras um pouco mais verticais, ainda menos que *Chironectes*, que representaram uma camada muscular mais uniforme ao longo da sua extensão, enquanto as fibras tenderam a se acumular mais próximas da inflexão nas outras espécies.

O *masseter pars profunda* se originou na face medial do arco zigomático e se inseriu na fossa massetérica em todos os espécimes, exceto em *Caluromys* que se inseriu mais em direção ao processo angular. A inserção nas outras espécies se limita até a linha massetérica formada pelo suporte posterior da fossa massetérica que é preenchido pelo músculo. As fibras possuem um trajeto mais vertical que o *masseter pars superficialis*, mas ainda são orientadas anteriormente. O *masseter pars profunda* se separou no *zygomaticomandibularis* na maioria dos indivíduos. O *zygomaticomandibularis* se originou mais acima na face medial do arco zigomático e se inseriu mais profundamente na fossa massetérica. As fibras desse músculo correm levemente mais verticais que o *masseter pars profunda*. O músculo em *Chironectes* foi até mais volumoso que o *masseter pars profunda*, mas geralmente representou uma camada muscular mais fina. Apenas *Didelphis* e *Lutreolina* não apresentaram um *zygomaticomandibularis* distinto, ao menos de maneira

consistente já que ele também não foi identificado em um dos espécimes juvenis de *Metachirus*. Fibras levemente mais verticais que o *masseter pars profunda* se misturam com a inserção do *temporalis pars superficialis* em *Didelphis*. No entanto, em *Lutreolina* já incide em fibras orientadas posteriormente que são características do *temporalis*.

Temporalis

O *temporalis* também possuiu duas porções distintas, uma mais superficial e outra profunda, através dos espécimes. O *temporalis pars superficialis* se originou na fáscia temporal e se inseriu na superfície lateral do processo coronóide da mandíbula; fibras correm para frente e baixo. Sua origem se estendeu dorsalmente no crânio para se fixar na crista sagital em *Didelphis*, *Lutreolina*, *Philander* e *Monodelphis*. *Chironectes* também possui a crista sagital, mas o *temporalis* não pareceu se fixar sobre ela. No entanto, é difícil descrever seguramente a extensão do *temporalis* neste espécime devido ao seu estado. *Marmosa*, *Caluromys*, *Marmosops* e *Metachirus* não possuem a crista sagital. O *temporalis pars superficialis* não se estendeu até a linha média do crânio nesses indivíduos. O limite superior correspondeu a linha temporal que se curva em direção à linha média mas não converge entre os lados como na crista sagital. A linha temporal junto com o processo pós-orbital delimitou o *temporalis pars superficialis* anteriormente, também evidente em *Chironectes*. As fibras mais caudais se originaram na crista nugal e tenderam a ser orientadas logo mais posteriormente quando houve a flexão posterior do crânio, como em *Caluromys* e *Marmosops*. O inverso foi achado em *Lutreolina* que, além de uma flexão pouco pronunciada, teve a crista sagital que acrescentou um trajeto relativamente mais vertical das fibras. Entretanto, a crista nugal bem desenvolvida em *Lutreolina* adicionou o componente posterior à medida que as fibras se estenderam mais inferiormente sobre ela. Apesar do trajeto mais vertical das fibras mais anteriores no crânio de *Lutreolina*, apenas em *Didelphis* voltaram-se para frente quando próximos da inserção no processo coronóide, ao menos mais superficialmente quando interagem com as fibras do masseter. A área de inserção também se estendeu mais inferiormente sob o ramo mandibular em *Didelphis*. Contudo, o maior acúmulo de fibras sempre ocorreu mais ao topo do processo

coronóide, entre o processo e a região superior do arco zigomático, em todos os indivíduos.

O *temporalis pars profunda* se originou atrás da órbita, na constrição pós-orbital e fossa temporal, e se inseriu na superfície medial do processo coronóide. Assim como o *temporalis pars superficialis*, também se estendeu ao longo da parede lateral do crânio em direção às cristas sagital (ou mais ao topo do crânio) e nugal. Ele alcançou a crista sagital em *Didelphis*, mas não em *Lutreolina*, *Philander* ou *Monodelphis*, embora se aproxime nesses outros. As fibras tenderam a se concentrar na constrição pós-orbital, especialmente nos gêneros de menor tamanho, e adquiriram um trajeto vertical mais pronunciado à medida que se aproximavam da órbita. As fibras mais rostrais, posicionadas logo atrás da órbita, até foram levemente anteriores em *Lutreolina*.

Pterygoideus medialis

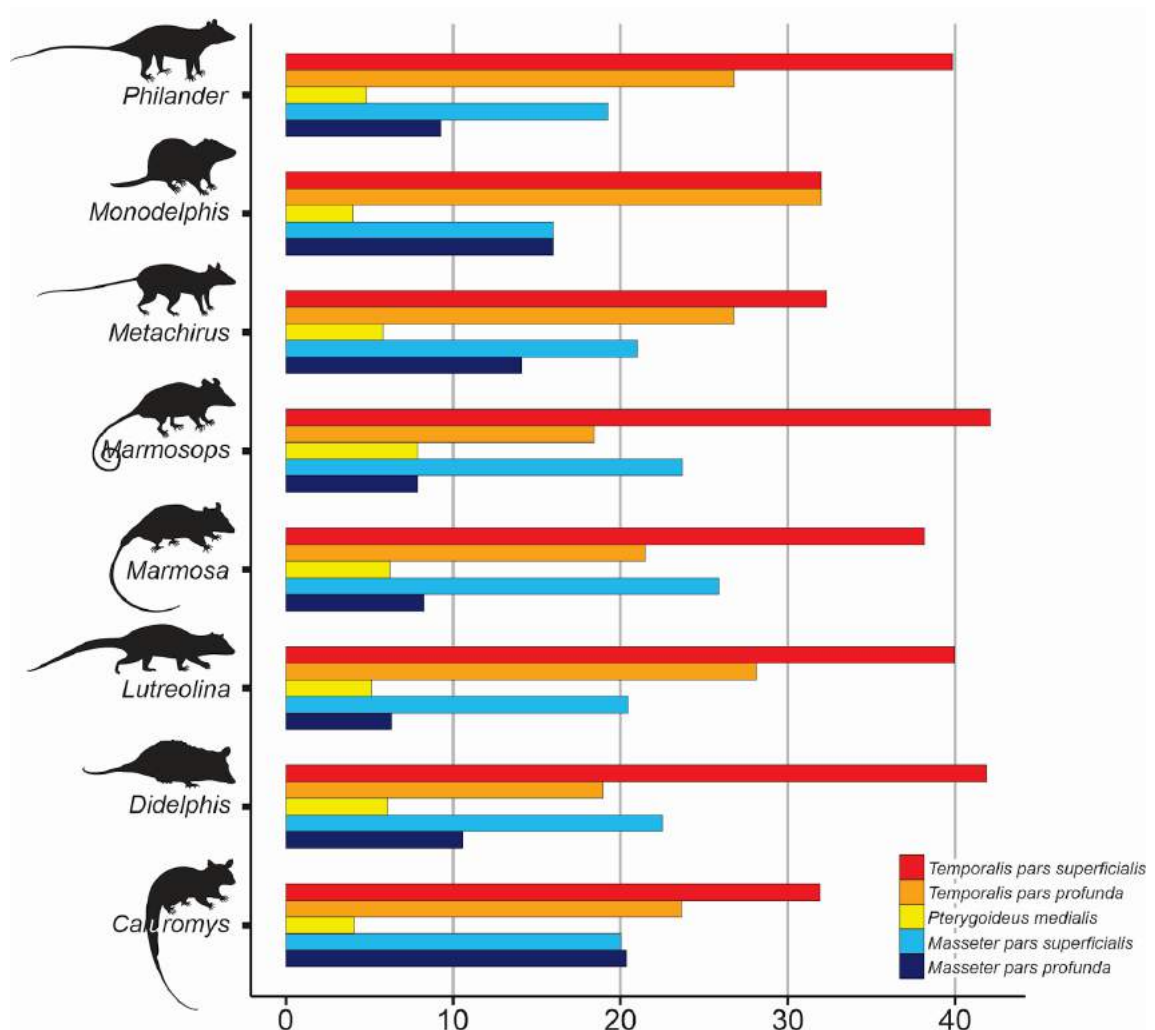
O *pterygoideus medialis* se originou no osso pterigoide até a região posterolateral do palato. As fibras correm para trás e baixo para se inserir no processo angular no lado medial da mandíbula. As fixações não variaram entre os gêneros. No entanto, devido à mudança na morfologia do processo angular em *Caluromys*, o *pterygoideus medialis* se insere relativamente mais inferior na mandíbula. O componente vertical do trajeto das fibras foi bem mais pronunciado em relação a outras espécies em que as fibras tenderam a correr mais lateralmente da origem para se inserirem ao longo do processo angular inflexionado. O *pterygoideus medialis* nessas espécies foram relativamente mais volumosos devido à camada adicional das fibras que são inseridas ao longo da extensão medial do processo.

4.3.2. Fração das massas musculares

A proporção média dos músculos adutores para cada gênero está representada na figura 3. A distribuição das massas indica uma maior dominância do complexo *temporalis*, seguido pelo complexo *masseter* (incluindo o *zygomaticomandibularis*) e *pterygoideus medialis*. O *temporalis* representou mais da metade da musculatura adutora em todos os gêneros ([~55.5%] - [~68.1%]). O *masseter* variou entre ~26.8% e ~40.4% com um grau compensatório com o

temporalis, enquanto o *pterygoideus medialis* foi mais conservado ([~4] - [~7.9]). *Caluromys* e *Lutreolina* se posicionaram nos extremos entre a importância relativa do *temporalis* e *masseter* para a musculatura adutora; ~55.5% e ~40.4% em *Caluromys*, e 68.1% e 26.8% em *Lutreolina*. As porções superficiais do *temporalis* e *masseter* contribuíram com uma maior fração da massa adutora total, exceto *Monodelphis* e *Caluromys* que apresentaram uma proporção semelhante das duas camadas, do *temporalis* e *masseter* (32% e 16%), e *masseter* (~20%), respectivamente. O *pterygoideus medialis* foi relativamente menor em *Monodelphis* e *Caluromys* (4% e ~4.1%), e maior em *Marmosops* (~7.9).

Figura 3. Proporções relativas da musculatura adutora. O *zygomaticomandibularis* foi somado ao *masseter pars profunda* para a comparação entre os gêneros. (Silhuetas por Milena Cavalcanti, Patricia Pilatti e Diego Astúa; Sarah Werning; e C. Camilo Julián-Caballero, em www.phylopic.org).

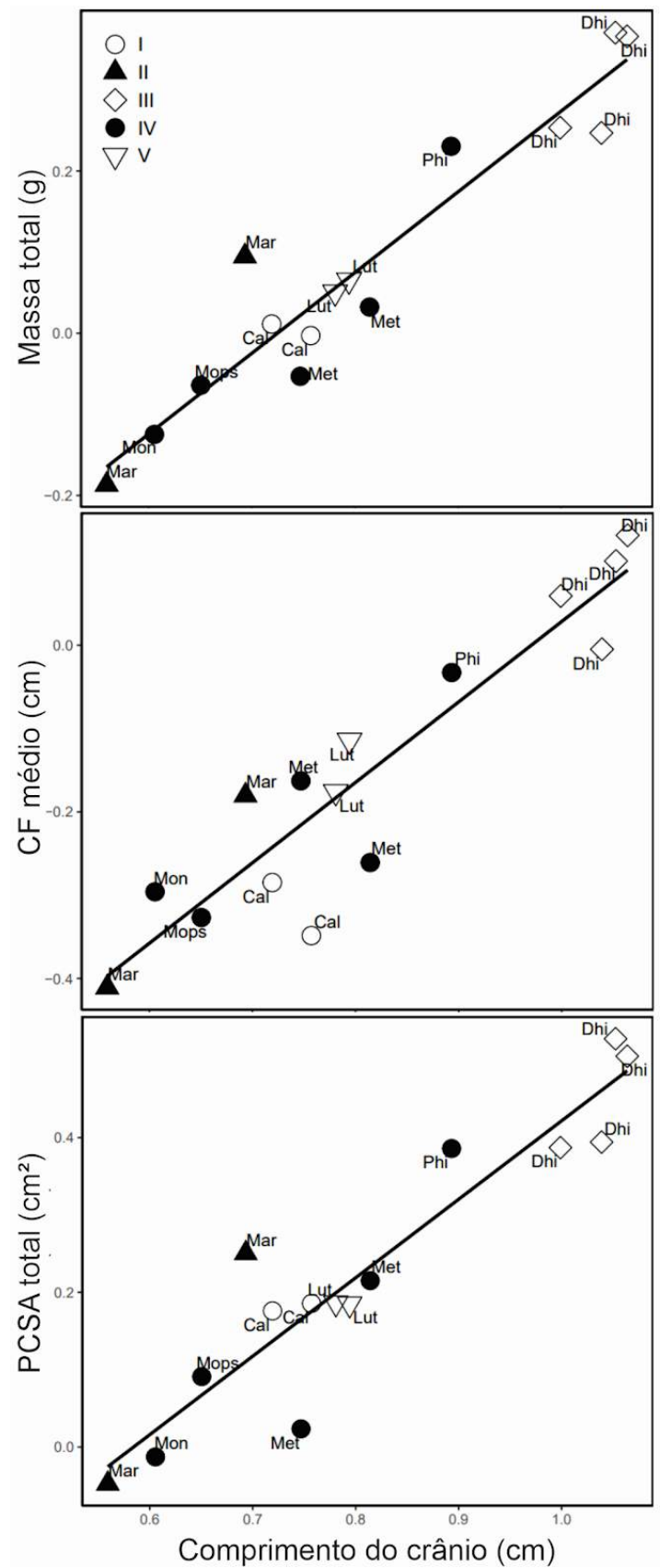


Fonte: O autor (2023)

4.3.3. Escalonamento das propriedades musculares e forças de mordida

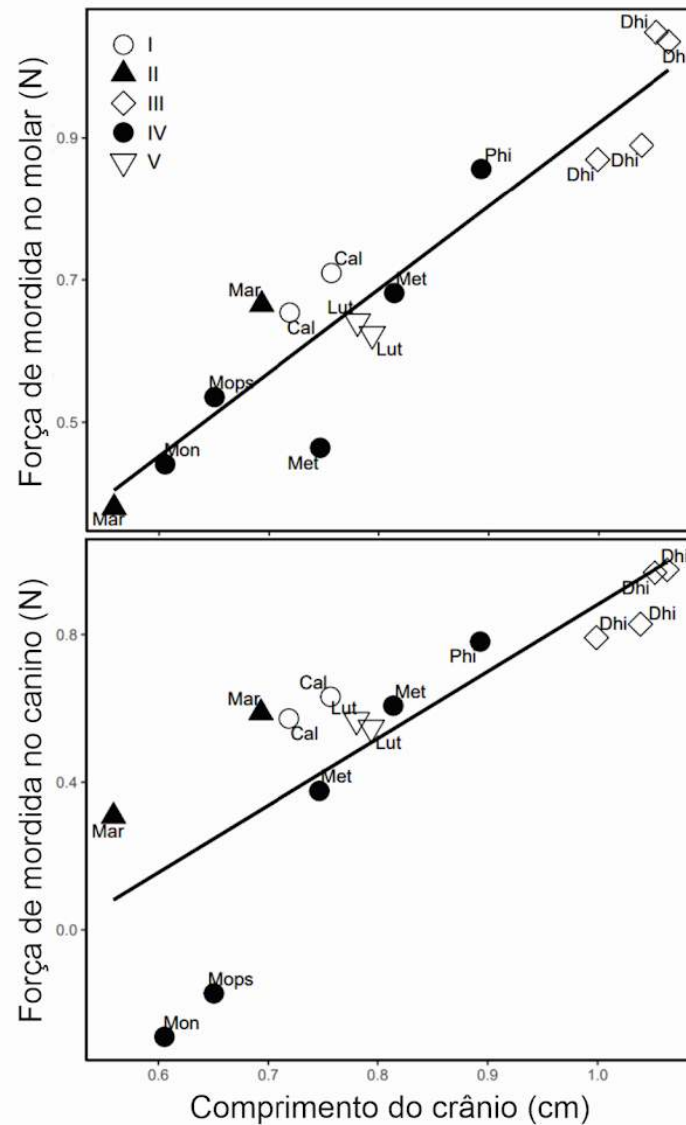
O comprimento do crânio foi um bom preditor das massas musculares ($r^2 = \sim 0.9$, $p = < 0.001$), das PCSAs ($r^2 = > 0.7$, $p = < 0.001$), do comprimento médio dos fascículos ($r^2 = > 0.7$, $p = < 0.001$), da força de mordida calculado no molar ($r^2 = 0.88$, $p = < 0.001$) e, mais moderado, para a força de mordida no canino ($r^2 = > 0.66$, $p = < 0.001$) (Tabela 2; Figura 4 e 5). As inclinações não foram diferentes do esperado para isometria em todas as variáveis (99.9% intervalo de confiança). Apenas as forças de mordida calculadas mostraram uma evidência moderada para alometria positiva (molar, 95% I.C. = 1.0367 - 1.457; canino, 95% I.C. = 1.593 - 2.861).

Figura 4. Regressão da massa, comprimento médio dos fascículos e PCSA da musculatura adutora com o comprimento do crânio. Dhi, *Didelphis*; Phi, *Caluromys*; Lut, *Lutreolina*; Mar, *Marmosa*; Met, *Metachirus*; Cal, *Caluromys*; Mops, *Marmosops*; Mon, *Monodelphis*.



Fonte: O autor (2023)

Figura 5. Regressão das forças de mordida no primeiro molar e canino com o comprimento do crânio. Abreviações na figura 4.



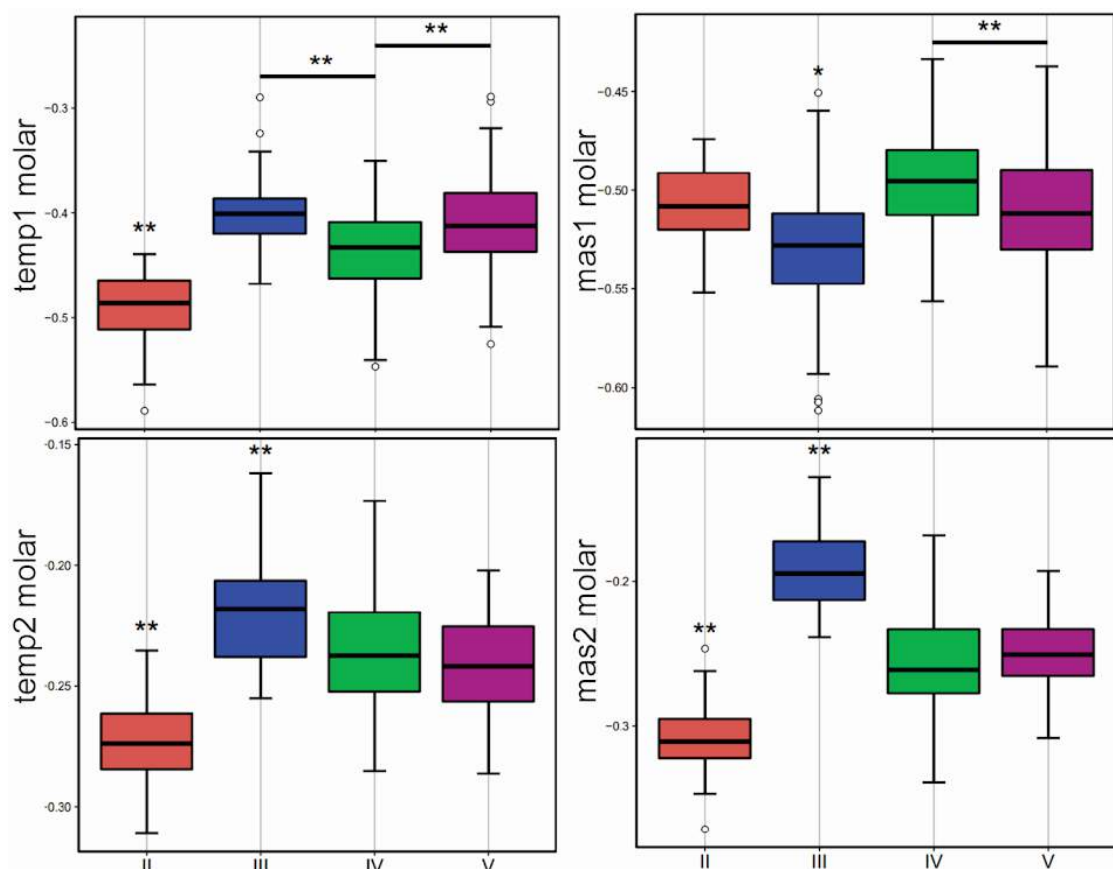
Fonte: O autor (2023)

4.3.4. Vantagem mecânica e Fator de extensão

A correlação da vantagem mecânica, estimada pelo modelo simples de alavanca, com o comprimento do crânio variou dependendo do braço de alavanca muscular (Tabela 3). A vantagem mecânica do *masseter pars profunda* (mas2) foi fortemente relacionada ($r = > 0.7$), mas a do *masseter pars superficialis* (mas1) demonstrou uma correlação fraca ($r = < 0.3$). O *temporalis* foi mais consistente, porém apresentou uma relação moderada da vantagem dos dois braços com o comprimento do crânio (temp1 e temp2; $0.4 > r < 0.6$). O fator de extensão do

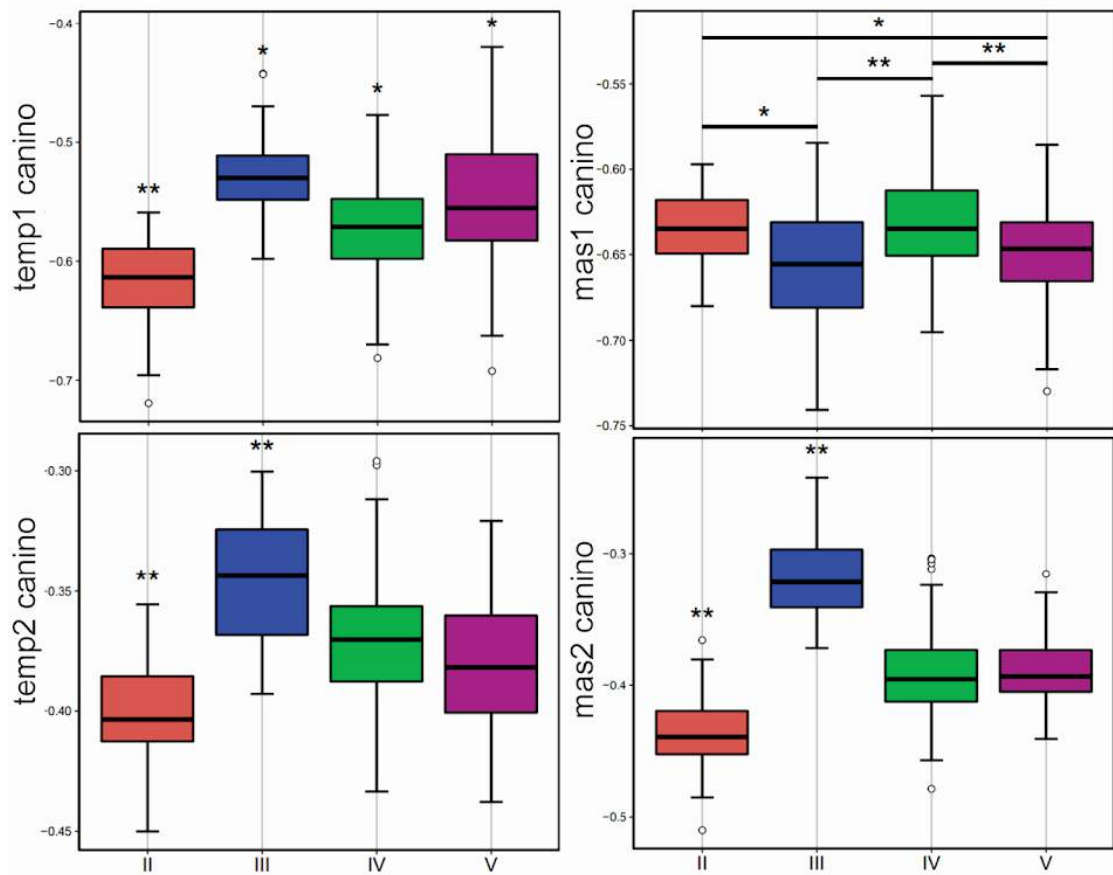
temporalis e *masseter* mostraram níveis mais baixos de correlação negativa, mas permaneceu forte para o *masseter* (*temporalis*, $r = -0.23$; *masseter*, -0.66 ; Tabela 3). Tanto a vantagem mecânica quanto o fator de extensão indicaram alometria negativa ($b < 1$) e foram diferentes entre os grupos de dieta ($p < 0.001$; Figura 6-8). Os resultados sugerem uma tendência para uma vantagem mecânica mais baixa dos mais frugívoros (II), exceto quando o braço *mas1* foi considerado para o molar e canino. O inverso ocorreu com os generalistas (III), que mantiveram uma alta vantagem na maioria dos braços de alavanca muscular. Os grupos de espécies mais insetívoras (IV) e carnívoras (V) se sobrepuseram na maioria das configurações, mas foram diferentes quando o *temp1* e *mas1* abordaram no molar. Já o fator de extensão foi mais alto nos mais frugívoros para o *temporalis*, e nos mais carnívoros para o *masseter*. Os generalistas tiveram o fator de extensão mais baixo para o *masseter*.

Figura 6. Diferenças da vantagem mecânica no primeiro molar entre os grupos de dieta; "**", $0.05 > p > 0.001$; "***", $p < 0.001$.



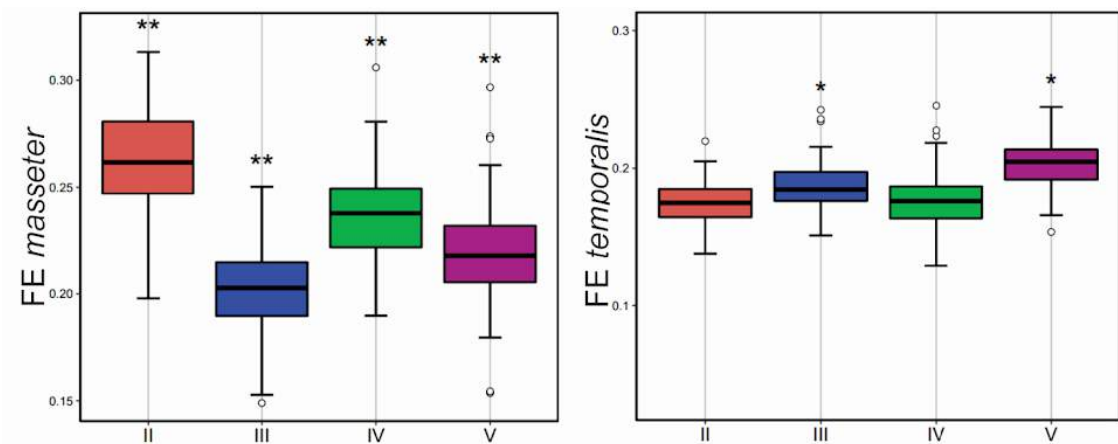
Fonte: O autor (2023)

Figura 7. Diferenças da vantagem mecânica no canino entre os grupos de dieta; "**", $0.05 > p > 0.001$; "***", $p < 0.001$.



Fonte: O autor (2023)

Figura 8. Diferenças do fator de extensão do *temporalis* e *masseter* entre os grupos de dieta; "**", $0.05 > p > 0.001$; "***", $p < 0.001$.



Fonte: O autor (2023)

4.3.5. Força de mordida e dieta

Não houve evidência de diferença na força de mordida entre os grupos de dieta ($p = 0.214$), e nem de correlação com a dureza.

4.4. Discussão

O aparato mastigatório dos didelfídeos é considerado generalizado entre os mamíferos (TURNBULL, 1970). Entretanto, apenas o gênero *Didelphis* foi notadamente representado e, com este manuscrito, pela primeira vez temos acesso a descrições e informações quantitativas de outros gêneros referentes a musculatura adutora da mandíbula. Identificamos os músculos *temporalis*, *pars superficialis* e *pars profunda*; *masseter*, *pars superficialis* e *pars profunda*; e *pterygoideus medialis*. O *zygomaticomandibularis* não foi visualizado em todos os indivíduos. A variação no tamanho relativo desses músculos demonstrou um padrão compensatório entre o *temporalis* e *masseter* que foi evidente em *Lutreolina* e *Caluromys*. Esses dois gêneros se posicionam sobre os extremos do gradiente alimentar de Didelphidae (LESSA; CARVALHO; ASTÚA, 2022; VIEIRA; ASTÚA DE MORAES, 2003), e exibiram algumas diferenças funcionais na morfologia muscular.

Lutreolina, juntamente com *Chironectes* e *Lestodelphys*, é um dos gêneros mais carnívoros da família Didelphidae. Seu *temporalis* representou quase 70% da massa adutora total. Essa grande dominância do *temporalis* se assemelha ao padrão observado em outros mamíferos carnívoros (TURNBULL, 1970) e corrobora com a descrição anatômica de Delupi, Carrera e Bianchini (1997). Os autores descreveram uma massa muscular mais desenvolvida em *Lutreolina* em relação a *Didelphis*, especialmente devido ao encurtamento do rostro e ampliação da fossa temporal. A crista sagital também ampliou a área de origem do *temporalis pars superficialis* e é bem desenvolvida na espécie, com uma altura que se mantém uniforme ao longo da sua extensão. Essa característica resultou em fibras caudais com orientações mais verticais que fornecem um braço de alavanca mais efetivo. Assim como Delupi, Carrera e Bianchini (1997), não identificamos o *zygomaticomandibularis* que foi distinto na maioria dos espécimes. Esse músculo também não foi observado em *Didelphis*, mas detectamos fibras com orientações levemente mais verticais que o *masseter pars profunda*, similar as do *zygomaticomandibularis*, como foi descrito por Diogo et al. (2016). Contudo, essas fibras não foram visualizadas em *Lutreolina* que já mantém uma orientação mais

posterior, o que é relevante para essa espécie que deve enfrentar a resistência das presas durante a predação. A origem do *masseter pars superficialis* também é reforçada com a extensão mais posterior sobre o arco zigomático, porém, nem tanto quanto em *Chironectes*, em que a origem cobriu a extensão inferior do arco zigomático (ver também SIDEBOTHAM, 1885). As fibras foram mais verticais e assim como o *temporalis pars superficialis* de *Lutreolina*, resulta num braço de alavanca maior. Essa diferença em relação aos outros gêneros pode refletir o hábito mais durofágico da espécie que se alimenta principalmente de crustáceos e vertebrados aquáticos (ANDRADE, 2017; ASTÚA, 2015b; LESSA; CARVALHO; ASTÚA, 2022). Infelizmente, devido ao estado do material, não conseguimos identificar seguramente o *temporalis*, mas Sidebotham (1885) também descreve duas camadas (superficial e profunda) que se inserem na superfície externa e interna do processo coronóide.

No outro extremo, *Caluromys* é um dos gêneros mais frugívoros de Didelphidae e apresentou uma proporção maior do *masseter*, e menor do *temporalis*. Esse resultado não é inesperado já que estudos ecomorfológicos sugerem um *masseter* proporcionalmente maior em *Caluromys* (ASTÚA DE MORAES, 1998), como também seria esperado um aumento proporcional do *pterygoideus medialis* devido a ampliação da sua área de inserção (GROSSNICKLE, 2020). Entretanto, *Caluromys* obteve a menor proporção do *pterygoideus medialis*, inclusive abaixo de *Lutreolina*, possivelmente devido a forma do processo angular. Diferente do restante dos didelfídeos, *Caluromys* não possui o processo angular inflexionado. A inserção do *pterygoideus medialis* nas outras espécies parece resultar em diferentes camadas de fibras que se inserem mais próximas da borda processo e sobre o suporte fornecido por ele no ramo horizontal da mandíbula. A ausência da inflexão do processo angular demonstrou um *pterygoideus medialis* mais reduzido, com fibras mais longas que se inserem próximas da borda do processo. Ainda não é claro como a morfologia do *pterygoideus medialis* interfere no movimento da mandíbula de *Caluromys*, mas pode reduzir vantagem do músculo para o rolamento da mandíbula (em torno do eixo ao longo de uma hemimandíbula) durante a mastigação (GROSSNICKLE, 2020). Isso associado com o *pterygoideus medialis* reduzido, que deve contribuir pouco para a "guinada" da mandíbula (rotação em torno de um eixo orientado verticalmente) (BHULLAR et al., 2020), podem aproximar os movimentos mandibulares de *Caluromys* aos dos carnívoros (GROSSNICKLE,

2020), conforme a morfologia do *pterygoideus medialis* se assemelha com a de carnívoros herbívoros como de *Ailuropoda* (DAVIS, 1964). A compreensão dessas funções mastigatórias é necessária para entendimento do morfotipo funcional representado por *Caluromys*.

A morfologia muscular nos demais gêneros investigados foi mais similar entre si, exceto pela ausência da crista sagital em *Marmosa*, *Marmosops* e *Metachirus*, que reduziu a área de fixação do *temporalis* no crânio. Isso aliado a órgãos dos sentidos relativamente maiores nas espécies de menor porte, poderia ser esperado uma musculatura adutora relativamente menor nesses indivíduos. No entanto, essas características não influenciaram o tamanho relativo do *temporalis*, que tendeu a ser dominante como em *Didelphis*, *Philander* e *Lutreolina*. A crista sagital nesses gêneros pode servir mais para a manutenção do tamanho do *temporalis pars superficialis* com o maior crescimento em relação aos outros didelfídeos. Isso foi demonstrado em *Metachirus* que, embora represente um gênero de maior tamanho entre os didelfídeos, não possui a crista sagital e apresentou uma redução da camada superficial do *temporalis*. De outra forma, a crista sagital parece favorecer o crescimento alométrico do *temporalis pars superficialis* ao longo da ontogenia; como foi apontado para *Didelphis albiventris* no capítulo 2. A ausência desse caráter em *Metachirus* pode ter impactado o tamanho do *temporalis* adulto que, como principal adutor do sistema mastigatório dos didelfídeos, pode ter contribuído para um menor força de mordida entre os grandes gêneros (em média da massa corpórea).

Assim como todas as propriedades musculares (massa, comprimento médio dos fascículos e PCSA), a força de mordida escalonou com isometria entre os didelfídeos. As relações isométricas da massa e PCSA com indicadores do tamanho corpóreo também foi observada em outros táxons (HARTSTONE-ROSE et al., 2018, 2022; PERRY, 2008; PERRY; WALL, 2008), mas a força de mordida em carnívoros tendeu a ser alométrica positivamente (HARTSTONE-ROSE et al., 2022). O padrão isométrico detectado nos didelfídeos indica que o tamanho e a força produzida pela musculatura adutora, e fornecida durante a mordida, são relativamente similares entre os indivíduos, que diferem apenas de maneira absoluta. Ou seja, didelfídeos maiores conseguem produzir forças maiores por serem maiores. Essa importância do tamanho está de acordo com o grau de integração morfológica apresentado pelo crânio dos didelfídeos (SHIRAI; MARROIG, 2010), como é relevante na variação morfológica dentro da família (CHEMISQUY et al., 2020). Isso corrobora a hipótese

de Silva-Neto, Pavan e Astúa (2023) de que o tamanho tenha possibilitado a diversificação da dieta dos didelfídeos. Espécies maiores, como as do gênero *Didelphis*, possuem uma força de mordida absolutamente maior, o que possibilita o consumo de itens diversos. Brum, Cáceres e Bubadué (2023) também identificaram que as espécies onívoras apresentaram os maiores tamanhos mandibulares, além de diferenças no tamanho entre categorias de dieta. Dessa forma, o tamanho constitui um dos principais fatores estruturando as relações entre os didelfídeos, que de outra maneira, estando num mesmo ambiente com uma morfologia similar, e se alimentando com uma dieta semelhante, estariam em competição direta. Entretanto, ainda não é claro se os didelfídeos aumentaram no tamanho geral para alimentação, ou por qualquer outro motivo que possibilitou a incorporação de outros itens aos hábitos alimentares, já que a alometria oferece um caminho mais rápido e de menor resistência para diversificação morfológica (BRUM; CÁCERES; BUBADUÉ, 2023).

A semelhança da força de mordida livre da alometria entre os didelfídeos justificam a ausência de diferenças ou da correlação com a dieta. As diferenças foram apenas evidentes para a vantagem mecânica e o fator de extensão dos músculos *temporalis* e *masseter*. A vantagem mecânica do grupo mais frugívoro, representado por *Marmosa murina*, foi inferior em quase todas as análises, exceto para a vantagem do *masseter pars superficialis*. Esse músculo obteve a maior proporção em *Marmosa* em relação aos outros gêneros investigados. A vantagem mecânica mais baixa de *M. murina* em relação aos outros braços musculares, fornece uma eficiência diferencial para movimentos mais rápidos da mandíbula (MISSAGIA et al., 2021), que podem estar associados ao consumo oportunista de presas identificadas na sua dieta (CARVALHO; FERNANDEZ; NESSIMIAN, 2005; LESSA; DA COSTA, 2010; PARREIRA CLARO; HANNIBAL, 2022). Em contrapartida, esperamos que as espécies mais carnívoras mostrassem uma vantagem mecânica maior. O rostro relativamente mais curto de *Lutreolina* sugeria um aprimoramento da vantagem mecânica com a redução dos braços de alavanca da mordida. Contudo, a vantagem foi principalmente sobreposta aos mais insetívoros. Já *Didelphis* apresentou os valores mais altos de vantagem mecânica. Isso pode ser devido a correlação positiva das vantagens mecânicas com o comprimento, embora as regressões apontem que o braço de alavanca muscular tende a crescer num ritmo mais lento que os de mordida.

Em compensação, o fator de extensão mostrou uma correlação negativa com o comprimento do crânio, embora fraca para o *temporalis*. *Marmosa murina* obteve claramente os valores mais altos para o fator de extensão do *masseter*, e *Didelphis* junto com as espécies mais carnívoras, os mais baixos. O inverso foi achado para o *temporalis*, mas com uma evidência moderada. O fator de extensão alto sugere uma maior necessidade da excursão muscular para atingir uma determinada abertura da boca. Quanto maior a excursão, mais as fibras se distanciam do comprimento de repouso, a qual o pico de tensão ativa pode ser produzido (HERRING; HERRING, 1974). O fator de extensão baixo para o principal músculo adutor garante uma menor redução da tensão produzida pelas fibras durante grandes aberturas de boca, que possivelmente seriam exigidas no consumo de itens relativamente maiores. Como alternativa, a redução da tensão produzida pode ser compensada pela maior massa muscular, como o *masseter* relativamente maior em *M. murina*. Isso não parece ser o caso para o *temporalis* em *Didelphis*. O fator de extensão nesse e dos gêneros mais carnívoros parece estar associado a crista sagital, mas novas análises são necessárias para mais detalhes da implicação desse fator na morfologia muscular.

4.5. Conclusão

Os didelfídeos apresentam uma morfologia conservada do aparato mastigatório, que tem permanecido generalizada em relação a outros mamíferos e correspondido a hábitos alimentares menos restritos. Apesar de serem considerados generalistas, a proporção dos itens na dieta varia desde os mais frugívoros aos mais carnívoros. Neste contexto, investigamos a anatomia, arquitetura muscular e relações funcionais associadas ao desempenho do aparato mastigatório, especialmente a força de mordida, relativos a variação da dieta e tamanho. Nós observamos que *Caluromys* e *Lutreolina*, que se posicionam sobre os extremos do gradiente alimentar de Didelphidae, exibiram as principais diferenças funcionais na morfologia muscular e tamanho relativo dos músculos *temporalis* e *masseter*. A massa, PCSA, e o comprimento médio dos fascículos foram isométricos através da amostra. A força de mordida também parece ser uma função do tamanho corpóreo, como não demonstrou diferença para a dieta, ou não foi correlacionado com um índice de dureza da dieta. Dessa forma, o aumento do tamanho pode ter favorecido

a diversificação da dieta nos mais onívoros, que tendem a ser maiores, como *Didelphis*. O aparato mastigatório de *Didelphis* também demonstrou ser eficiente para a produção da força de mordida e abertura da boca, conforme manteve uma vantagem mecânica alta para a maioria dos músculos analisados, e um fator de extensão muscular baixo para o *masseter*, que pode empregar no consumo menos restrito de itens alimentares, como aqueles maiores e mais duros.

4.6. Tabelas

Tabela 1. Espécimes usados no estudo.

Espécie	ID	Idade	Estado	CC	Massa total	CF médio	PCSA total	Força de mordida m1	Força de mordida c
<i>Didelphis albiventris</i>	DAM900	Adulto	Álcool	11.285	12.945	1.261	11.364	124.926	86.37
<i>Didelphis albiventris</i>	DAM904	Adulto	Fresco	9.975	5.76	1.145	5.944	54.825	38.291
<i>Didelphis albiventris</i>	DAM905	Adulto	Fresco	10.939	5.51	0.989	6.143	60.163	45.316
<i>Didelphis albiventris</i>	DAM903	Adulto	Fresco	11.583	12.54	1.355	10.243	117.581	89.477
<i>Philander quica</i>	UFMG2187	Adulto	Álcool	7.82	4.918	0.927	5.912	51.605	36.44
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	UFMG7991	Adulto	Álcool	6.225	1.571	0.769	2.343	17.668	12.447
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	UFMG7990	Adulto	Álcool	6.036	1.42	0.667	2.357	19.173	13.699
<i>Metachirus myosurus</i>	UFMG8413	Juvenil	Álcool	5.583	0.693	0.687	1.114	8.471	5.654
<i>Metachirus myosurus</i>	UFMG2185	Adulto	Álcool	6.519	1.25	0.548	2.692	23.0524	16.383
<i>Caluromys</i>	UFMG8409	Adulto	Álcool	5.716	0.98	0.448	2.351	26.245	18.31
<i>Caluromys</i>	UFMG8410	Juvenil	Álcool	5.238	1.082	0.519	2.249	20.316	13.952
<i>Marmosa</i>	UFMG8411	Adulto	Álcool	4.934	1.927	0.66	3.17	21.401	14.996
<i>Marmosa murina</i>	UFMG8412	Adulto	Álcool	3.624	0.275	0.388	0.804	5.755	4.126
<i>Marmosops</i>	UFMG8406	Adulto	Álcool	4.471	0.642	0.471	1.521	11.761	0.449
<i>Monodelphis</i>	UFMG8403	Adulto	Álcool	4.032	0.422	0.506	0.943	7.617	0.261
<i>Chironectes minimus</i>	UFMG8408	Juvenil	Álcool	7.461					

ID: Identificação; CF: Comprimento médio dos fascículos.

Fonte: O autor (2023)

Tabela 2. Estatística das regressões de principal eixo reduzido (RMA).

Variável	Intercept		r	r ²	I.C. 99.9%**
	o	b*			
Massa <i>temporalis</i>	-0.847	1.063	0.945	0.893	0.692-1.433
Massa <i>masseter</i>	-0.913	1.029	0.944	0.891	0.685-1.372
Massa <i>pterygoideus medialis</i>	-1.201	1.066	0.952	0.907	0.737-1.395
Massa adutora total	-0.762	1.045	0.952	0.907	0.705-1.386
CF <i>temporalis</i>	-0.922	0.971	0.912	0.832	0.546-1.396
CF <i>masseter</i>	-1.135	1.204	0.93	0.866	(-5.346)-7.754
CF <i>pterygoideus</i>	-1.216	0.937	0.859	0.737	0.451-1.423
CF médio adutor	-1.003	1.046	0.923	0.851	0.615-1.477
PCSA <i>temporalis</i>	-0.825	1.147	0.927	0.859	0.687-1.607
PCSA <i>masseter</i>	-0.837	1.006	0.888	0.788	0.537-1.474
PCSA <i>pterygoideus</i>	-1.296	1.271	0.882	0.777	0.664-1.878
PCSA adutora total	-0.652	1.088	0.932	0.869	0.667-1.509
Força de mordida m1	-0.312	1.247	0.939	0.882	0.790-1.704
Força de mordida c	-1.268	2.227	0.815	0.664	0.848-3.606

Fonte: O autor (2023)

Tabela 3. Correlação e estatística das regressões de Theil-Sem.

Variável	r	Intercept		I.C. 99.9%**
		o	b*	
VM <i>temporalis pars superficialis</i> m1	0.546	-0.583	0.207	0.190-0.240
VM <i>temporalis pars profunda</i> m1	0.579	-0.339	0.129	0.114-0.140
VM <i>masseter pars superficialis</i> m1	-0.215	-0.469	-0.052	(-0.077)-(-0.036)
VM <i>masseter pars profunda</i> m1	0.781	-0.476	0.282	0.268-0.309
VM <i>temporalis pars superficialis</i> c	0.535	-0.72	0.208	0.190-0.245
VM <i>temporalis pars profunda</i> c	0.487	-0.463	0.115	0.103-0.140
VM <i>masseter pars superficialis</i> c	-0.22	-0.602	-0.054	(-0.0780)-(-0.040)
VM <i>masseter pars profunda</i> c	0.745	-0.59	0.256	0.249-0.296
Fator de extensão <i>temporalis</i>	-0.227	0.143	0.053	0.039-0.0692
Fator de extensão <i>masseter</i>	-0.657	0.356	-0.167	(-0.181)-(-0.150)

Fonte: O autor (2023)

5. CONCLUSÃO GERAL

O objetivo deste estudo foi aumentar a nossa compreensão da musculatura mastigatória dos didelfídeos e sua relação funcional com a variação da dieta. *Didelphis albiventris* representou um modelo para análise miológica comparativa da ontogenia dos músculos mastigatórios. O crescimento alométrico da musculatura resultou em músculos relativamente maiores nos adultos e provavelmente uma força de mordida maior. Essa força é utilizada no consumo de itens mais difíceis de serem consumidos, mas *D. albiventris* tende a manter uma dieta mais onívora desde cedo na ontogenia, favorecido pela vantagem mecânica e uma organização muscular que se desenvolve logo após o desmame. Estudos adicionais com outros didelfídeos e marsupiais podem esclarecer um padrão geral de crescimento dos músculos mastigatórios e/ou trajetórias ontogenéticas que conduzem formas menos generalizadas do aparato mastigatório associadas aos hábitos alimentares.

A anatomia da musculatura adutora dos gêneros mais carnívoros e frugívoros foram mais divergentes através da amostra dos didelfídeos. A massa, comprimento médio dos fascículos e PCSA adutor escalonou com isometria junto com as forças de mordida no canino e primeiro molar, diferente do padrão alométrico observado durante o crescimento de *D. albiventris*. As forças de mordida quando corrigidas pelo tamanho não demonstraram diferenças significativas ou correlacionaram com a dieta. A diversificação dos itens alimentares parece ser suportada pelo tamanho corpóreo, conforme a variação da força de mordida foi absoluta. O papel filogenético nesses resultados permanece a ser estudado em novos estudos com amostras taxonomicamente mais amplas.

6. REFERÊNCIAS

- ABDALA, F.; FLORES, D. A.; GIANNINI, N. P. Postweaning Ontogeny of the Skull of *Didelphis Albiventris*. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 1, p. 190–200, 2001.
- ABREU, J. A. F. DE H.; GUILHON, G. N.; ASTÚA, D. Técnicas para o estudo da musculatura em pequenos mamíferos: dissecação clássica e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA). **Brazilian Journal of Mammalogy**, v. e92, p. e922023111, 22 out. 2023.
- ADAMS, D. C.; OTÁROLA-CASTILLO, E. geomorph: an *r* package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 393–399, 2 abr. 2013.
- ADAMS, R. A.; PEDERSEN, S. C. Integrating ontogeny into ecological and evolutionary investigations. Em: ADAMS, R. A.; PEDERSEN, S. C. (Eds.). **Ontogeny, Functional Ecology, and Evolution of Bats**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 1–8.
- AERTS, P. et al. Introduction. Pp. 1-4, In: AERTS, P. et al. (Eds.). **Topics in functional and ecological vertebrate morphology**. Maastricht: Shaker Publishing, 2002. p. 1-4.
- ANAPOL, F.; BARRY, K. Fiber architecture of the extensors of the hindlimb in semiterrestrial and arboreal guenons. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 99, n. 3, p. 429-447, mar. 1996.
- ANAPOL, F.; SHAHNOOR, N.; ROSS, C. F. Scaling of reduced physiologic cross-sectional area in primate muscles of mastication. In: VINYARD, C.; RAVOSA, M.J.; WALL, C. (Eds.). **Primate craniofacial function and biology**. Boston: Springer, 2008. p. 201-216.
- ANDRADE, P. C. B. **Partição de recursos entre carnívoros simpátricos (Didelphimorphia e Carnivora) em um arroio de Mata Atlântica no sul do Brasil**. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2017.
- ASTÚA, D. Cranial sexual dimorphism in New World marsupials and a test of Rensch's rule in Didelphidae. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 4, p. 1011–1024, 2010.
- ASTÚA, D. Family Didelphidae (opossums). In: WILSON, D. E.; MITTERMEIER, R. A. (Eds.). **Handbook of the mammals of the world - Monotremes and marsupials**. 1st edn ed. Barcelona: Lynx Edicions, 2015. p. 70–186.
- ASTÚA, D. Morphometrics of the largest New World marsupials, opossums of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Oecologia Australis**, v. 19, n. 01, p. 117–142, 2015.
- ASTÚA, D.; CHEREM, J. J.; TETA, P. Taxonomic Checklist of Living American Marsupials. In: **American and Australasian Marsupials**. [s.l.] Springer International Publishing, 2022. p. 1–48.

ASTÚA, D.; GUILHON, G. Morphology, Form, and Function in Didelphid Marsupials. In: CÁCERES, N. C.; DICKMAN, C. R. (Eds.). **American and Australasian Marsupials**. Cham: Springer, 2022. p. 483–513.

ASTÚA DE MORAES, D. **Análise Morfométrica do Crânio e da Mandíbula de Marsupiais Didelfídeos: Implicações Ecológicas e Funcionais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.

ASTÚA DE MORAES, D. et al. A geometric morphometric analysis of cranial and mandibular shape variation of didelphid marsupials. **Hystrix**, v. 10, n. 2, 2000.

AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M. G. **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados**. São Paulo: Instituto Pau Brasil de História Natural, 2002.

BECERRA, F. et al. Another one bites the dust: Bite force and ecology in three caviomorph rodents (Rodentia, Hystricognathi). **Journal of Experimental Zoology**, v. 321, n. 4, p. 220–232, 2014.

BELS, V.; HERREL, A. Feeding, a tool to understand vertebrate evolution introduction to “feeding in vertebrates”. In: BELS, V.; WHISHAW, I. (Eds.). **Feeding in vertebrates: Evolution, morphology, behavior, biomechanics**. Cham: Springer, 2019. p. 1-18.

BENNETT, C. V.; GOSWAMI, A. Statistical support for the hypothesis of developmental constraint in marsupial skull evolution. **BMC Biology**, v. 11, p. 52, 26 dez. 2013.

BHULLAR, B. S. et al. Rolling of the jaw is essential for mammalian chewing and tribosphenic molar function. **Nature**, v. 566, p. 528–532, 2019.

BINDER, W. J.; VAN VALKENBURGH, B. Development of bite strength and feeding behaviour in juvenile spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **Journal of Zoology**, v. 252, n. 3, p. 273–283, nov. 2000.

BÖHMER, C. et al. **Atlas of terrestrial mammal limbs**. Boca Raton: CRC Press, abr. 2020.

BRASSARD, C. et al. Bite force and its relationship to jaw shape in domestic dogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 16, 1 ago. 2020a.

BRASSARD, C. et al. Interrelations Between the Cranium, the Mandible and Muscle Architecture in Modern Domestic Dogs. **Evolutionary Biology**, v. 47, n. 4, p. 308–324, 1 dez. 2020b.

BRASSARD, C. et al. Masticatory system integration in a commensal canid: interrelationships between bones, muscles, and bite force in the red fox. **Journal of Experimental Biology**, v. 224, n. 5, jeb224394, mar. 2021.

BRUM, M. N.; CÁCERES, N. C.; BUBADUÉ, J. M. Evolutionary rates, disparity, and ecomorphology of the mandible in American marsupials. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 30, n. 1, p. 33–46, 15 mar. 2023.

BUSCH, M.; KRAVETZ, F. O. Diet composition of monodelphis dimidiata (marsupialia, didelphidae). **Mammalia**, v. 55, n. 4, p. 619–648, 1991.

CÁCERES, N. C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 97–104, ago. 2002.

CÁCERES, N. C. Diet of three didelphid marsupials (Mammalia, Didelphimorphia) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, n. 6, p. 430–433, 2004.

CAKENBERGHE, V. VAN; HERREL, A.; AGUIRRE, L. F. Evolutionary relationships between cranial shape and diet in bats (Mammalia: Chiroptera). In: AERTS, P. et al. (Eds.). **Topics in Functional and Ecological Vertebrate Morphology**. Maastricht: Shaker Publishing, 2002. p. 205–236.

CAMPBELL-MALONE, R. et al. Ontogenetic Changes in Mammalian Feeding: Insights from Electromyographic Data. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 2, p. 282–288, ago. 2011.

CARVALHO, F. M. V.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. **Mammalian Biology**, v. 70, n. 6, p. 366–375, 16 nov. 2005.

CARVALHO, R. F. DE; PASSOS, D. C.; LESSA, L. G. Diet variations in short-tailed opossum *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia, Didelphidae) due to seasonal and intersexual factors. **Mastozoología Neotropical**, v. 26, n. 2, p. 340–348, dez. 2019.

CASELLA, J.; CÁCERES, N. C. Diet of four small mammal species from Atlantic Forest patches in South Brazil. **Neotrop Biol Conserv**, v. 1, p. 5–11, 2006.

CASTILHEIRO, W. F. F.; SANTOS FILHO, M. DOS. Diet of *Monodelphis glirina* (Mammalia: Didelphidae) in forest fragments in southern Amazon. **Zoologia**, v. 30, n. 3, p. 249–254, 2013.

CHAZEAU, C. et al. Proximate determinants of bite force capacity in the mouse lemur. **Journal of Zoology**, v. 290, n. 1, p. 42–48, mai. 2013.

CHEMISQUY, M. A. et al. Form, Function and Evolution of the Skull of Didelphid Marsupials (Didelphimorphia: Didelphidae). **Journal of Mammalian Evolution**, v. 28, p. 23–33, 1 mar. 2020.

CLARK, C. T.; SMITH, K. K. Cranial osteogenesis in *Monodelphis domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropodidae). **Journal of Morphology**, v. 215, n. 2, p. 119–149, fev. 1993.

CLEUREN, J.; AERTS, P.; DE VREE, F. Bite and joint force analysis in *Caiman crocodilus*. **Belgian Journal of Zoology**, v. 125, n. 1, p. 79–94, 1995.

CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 129–197, jan. 1972.

COUES, E. **The osteology and myology of *Didelphys virginiana***. Boston: Memoirs of the Boston Society of Natural History, 1872. v. 2, pt. 1, n. 3

COX, P. G. et al. Morphological and functional variation between isolated populations of British red squirrels (*Sciurus vulgaris*). **Journal of Zoology**, v. 312, p. 271–283, 1 dez. 2020.

CROIX, S. LA et al. Ontogeny of feeding performance and biomechanics in coyotes. **Journal of Zoology**, v. 285, n. 4, p. 301–315, 8 dez. 2011.

CROMPTON, A. W. The Origin of Mammalian Occlusion. *In: Orthodontics*. [s.l.] University of Pennsylvania Press, 1981. p. 3–18.

CROMPTON, A. W.; HIIEMAE, K. Molar occlusion and mandibular movements during occlusion in the American opossum, *Didelphis marsupialis* L. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 49, n. 1, p. 21–47, fev. 1970.

CROOK, T. C. et al. Comparative anatomy and muscle architecture of selected hind limb muscles in the Quarter Horse and Arab. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 2, p. 144–152, fev. 2008.

DA SILVA, J. M. et al. The relationship between cranial morphology, bite performance, diet, and habitat in a radiation of dwarf chameleon (*Bradypodion*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 119, n.1, p. 52–67, set. 2016.

DAVIS, D. D. **Masticatory apparatus in the spectacled bear, *Tremarctos ornatus***. Chicago: Chicago Natural History Museum, Fieldiana, Zoology, v. 37, n. 2, 1955.

DAVIS, D. D. **The giant panda: a morphological study of evolutionary mechanisms**. Chicago: Chicago Natural History Museum, Fieldiana, Zoology memoirs, 1964. v. 3

DAWSON, R.; MILNE, N.; WARBURTON, N. M. Muscular anatomy of the tail of the western grey kangaroo, *Macropus fuliginosus*. **Australian Journal of Zoology**, v. 62, n. 2, p. 166–174, 2014.

DE IULIIS, G.; PULERÀ, D. **The dissection of vertebrates**. Elsevier/ Academic Press, 2019.

DE SOUZA JUNIOR, P. et al. Functional myology of the thoracic limb in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*): a descriptive and comparative analysis. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 6, p. 783–806, dez. 2018.

DE SOUZA JUNIOR, P. et al. Evolutionary history or function? Which preponderates in the expression of the muscle mass of the thoracic limb in wild carnivorans?. **Anatomical Record**, v. 304, n. 6, p. 1344–1356, jun. 2021.

DEGUCHI, T.-A.; TAKEMURA, A.; SUWA, F. The Laminar Structure of the Common Opossum Masseter (*Didelphis marsupialis*). **Okajimas Folia Anat. Jpn**, v. 77, n. 6, p. 233–242, 2001.

DELUPI, L. H.; CARRERA, M. H.; BIANCHINI, J. J. Morfología comparada de la musculatura craneal en *Lutreolina crassicaudata* (Desmarest, 1804) y *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Marsupialia: Didelphidae). **PHYSIS (Buenos Aires), Secc. C**, v. 53(124–125), p. 19–28, 1997.

DEUTSCH, A. R. et al. Scaling of anatomically derived maximal bite force in primates. **Anatomical Record**, v. 303, n. 7, p. 2026-2035, jul. 2020.

DICKINSON, E. et al. Visualization and quantification of digitally dissected muscle fascicles in the masticatory muscles of *Callithrix jacchus* using nondestructive DiceCT. **Anatomical Record**, v. 302, n.11, p. 1891-1900, nov. 2019.

DICKINSON, E. et al. Evaluating bony predictors of bite force across the order Carnivora. **Journal of Morphology**, v. 282, n. 10, p. 1499–1513, 2021.

DICKINSON, E.; HARTSTONE-ROSE, A. Behavioral correlates of fascicular organization: The confluence of muscle architectural anatomy and function. **The Anatomical Record**, p. 1–13, 7 mar. 2023.

DICKINSON, E.; STARK, H.; KUPCZIK, K. Non-Destructive determination of muscle architectural variables through the use of DiceCT. **Anatomical Record**, v. 301, n. 2, p. 363-377, fev. 2018.

DIOGO, R. **Evolution driven by organismal behavior**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

DIOGO, R. et al. Comparative Myology and Evolution of Marsupials and Other Vertebrates, With Notes on Complexity, Bauplan, and “Scala Naturae.” **The Anatomical Record**, v. 299, n. 9, p. 1224–1255, 2016.

DOUGLASS, J. K.; WCISLO, W. T. An inexpensive and portable microvolumeter for rapid evaluation of biological samples. **BioTechniques**, v. 49, n. 2, p. 566-572, ago. 2010.

DRUZINSKY, R. E.; DOHERTY, A. H.; DE VREE, F. L. Mammalian masticatory muscles: Homology, nomenclature, and diversification. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 2, p. 224-234, ago. 2011.

DUMONT, E. R. et al. Built to bite: cranial design and function in the wrinkle-faced bat. **Journal of Zoology**, v. 279, n. 4, p. 329–337, dez. 2009.

ELLIS, J. L. et al. Calibration of estimated biting forces in domestic canids: Comparison of post-mortem and in vivo measurements. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 6, p. 769–780, jun. 2008.

ELLIS, J. L. et al. Cranial dimensions and forces of biting in the domestic dog. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 3, p. 362–373, 2009.

FABRE, P.-H. et al. Masticatory muscle architecture in a water-rat from Australasia (Murinae, *Hydromys*) and its implication for the evolution of carnivory in rodents. **Journal of Anatomy**, v. 231, n. 3, p. 380–397, 1 set. 2017.

FAHN-LAI, P.; BIEWENER, A. A.; PIERCE, S. E. Broad similarities in shoulder muscle architecture and organization across two amniotes: Implications for reconstructing non-mammalian synapsids. **PeerJ**, v. 8, p. e8556, 2020.

FARIA, M. B.; LANES, R. O.; BONVICINO, C. R. **Marsupiais do Brasil Guia de identificação com base em caracteres morfológicos externos e cranianos**. 1. ed. São Caetano do Sul: Amélie Editorial, 2019.

FERNANDEZ, F. A. S. et al. Natural history of the water opossum *Chironectes minimus*: A review. **Oecologia Australis**, v. 19, n. 1, p. 47–62, 2015.

FILAN, S. L. Development of the middle ear region in *Monodelphis domestica* (Marsupialia, Didelphidae): marsupial solutions to an early birth. **Journal of Zoology**, v. 225, n. 4, p. 577–588, 23 dez. 1991.

FISHER, R. E. et al. The phylogeny of the red panda (*Ailurus fulgens*): Evidence from the hindlimb. **Journal of Anatomy**, v. 213, n. 5, p. 607–628, 2008.

FLORES, D. A. et al. Post-Weaning Cranial Growth in Shrew Opossums (Caenolestidae): A Comparison with Bandicoots (Peramelidae) and Carnivorous Marsupials. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 22, p. 285–303, 19 set. 2015.

FLORES, D. A.; ABDALA, F.; GIANNINI, N. Cranial ontogeny of *Caluromys philander* (Didelphidae: Caluromyinae): a qualitative and quantitative approach. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 3, p. 539–550, 16 jun. 2010.

FLORES, D. A.; ABDALA, F.; GIANNINI, N. P. Postweaning Skull Growth in Living American and Australasian Marsupials: Allometry and Evolution. Em: CÁCERES, N. C.; DICKMAN, C. R. (Eds.). **American and Australasian Marsupials**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 357–401.

FLORES, D. A.; GIANNINI, N. P.; ABDALA, F. Cranial ontogeny of *Lutreolina crassicaudata* (Didelphidae): a comparison with *Didelphis albiventris*. **Acta Theriologica**, v. 48, n. 1, p. 1–9, mar. 2003.

FLORES, D. A.; GIANNINI, N.; ABDALA, F. Evolution of post-weaning skull ontogeny in New World opossums (Didelphidae). **Organisms Diversity & Evolution**, v. 18, p. 367–382, 1 set. 2018.

FORD, K. L. et al. A new era of morphological investigations: Reviewing methods for comparative anatomical studies. **Integrative Organismal Biology**, v. 5, n. 1, obad008, jan. 2023.

GARLAND, T. JR.; LOSOS J. B. Ecological morphology of locomotor performance in squamate reptiles. In: WAINWRIGHT, P. C.; REILLY, S. M. (Eds.) **Ecological morphology: Integrative organismal biology**. Chicago: University of Chicago Press, 1994. p. 240–302.

GEMMELL, R. T.; VEITCH, C.; NELSON, J. Birth in marsupials. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 4, p. 621–630, abr. 2002.

GERMAN, R. Z.; CROMPTON, A. W. Ontogeny of Suckling Mechanisms in Opossums (*Didelphis virginiana*). **Brain, Behavior and Evolution**, v. 48, p. 157–164, 1996.

GERMAN, R. Z.; CROMPTON, A. W. The ontogeny of feeding in mammals. Em: SCHWENK, K. (Ed.). **Feeding: Form, Function and Evolution in Tetrapod Vertebrates**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 449–457.

GIANNINI, N. P.; ABDALA, F.; FLORES, D. A. Comparative Postnatal Ontogeny of the Skull in *Dromiciops gliroides* (Marsupialia: Microbiotheriidae). **American Museum Novitates**, v. 3460, p. 1–17, 2004.

GINOT, S. et al. Skull size and biomechanics are good estimators of *in vivo* bite force in murid rodents. **Anatomical Record**, v. 301, n. 2, p. 256–266, fev. 2018.

GORNIK, G. C. Trends in the Actions of Mammalian Masticatory Muscles. **American Zoologist**, v. 25, n. 2, p. 331–338, 1 maio 1985.

GREAVES, W. S. The orientation of the force of the jaw muscles and the length of the mandible in mammals. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 4, p. 367–374, 1991.

GREAVES, W. S. **The mammalian jaw: a mechanical analysis**. [s.l.] Cambridge University Press, 2012.

GROSSNICKLE, D. M. Jaw roll and jaw yaw in early mammals. **Nature**, v. 582, n. 7812, p. E6–E8, 18 jun. 2020.

HARTSTONE-ROSE, A. et al. Dietary Correlates of Primate Masticatory Muscle Fiber Architecture. **The Anatomical Record**, v. 301, n. 2, p. 311–324, 1 fev. 2018.

_____. Masticatory muscle architectural correlates of dietary diversity in Canidae, Ursidae, and across the order Carnivora. **The Anatomical Record**, v. 305, n. 2, p. 477–497, 1 fev. 2022.

HARTSTONE-ROSE, A.; DICKINSON, E. Functional correlates of lemur masticatory muscle fiber architecture visualized in 3D using DiceCT. **The FASEB Journal**, v. 36, n. S1, mai. 2022.

HARTSTONE-ROSE, A.; HERTZIG, I.; DICKINSON, E. Bite Force and Masticatory Muscle Architecture Adaptations in the Dietarily Diverse Musteloidea (Carnivora). **The Anatomical Record**, v. 302, n. 12, p. 2287–2299, 1 dez. 2019.

HARTSTONE-ROSE, A.; PERRY, J. M. G.; MORROW, C. J. Bite Force Estimation and the Fiber Architecture of Felid Masticatory Muscles. **The Anatomical Record**, v. 295, n. 8, p. 1336–1351, ago. 2012.

HERREL, A. et al. The implications of bite performance for diet in two species of lacertid lizards. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 4, p. 662–670, 2001.

HERREL, A. et al. Morphological and mechanical determinants of bite force in bats: Do muscles matter? **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 1, p. 86–91, jan. 2008.

HERREL, A.; AERTS, P.; VREE, F. DE. Static biting in lizards: functional morphology of the temporal ligaments. **Journal of Zoology**, v. 244, n. 1, p. 135–143, 1998.

HERREL, A.; GIBB, A. C. Ontogeny of Performance in Vertebrates. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 1, p. 1–6, jan. 2006.

HERRING, S. W. The role of canine morphology in the evolutionary divergence of pigs and peccaries. **Journal of Mammalogy**, v. 53, n. 3, p. 500–512, set. 1972.

HERRING, S. W. The Ontogeny of Mammalian Mastication. **American Zoologist**, v. 25, n. 2, p. 339–350, 1985.

HERRING, S. W. Functional Morphology of Mammalian Mastication. **American Zoologist**, v. 33, n. 3, p. 289–299, 1993.

HERRING, S. W.; HERRING, S. E. The superficial masseter and gape in mammals. **The American Naturalist**, v. 108, n. 962, p. 561–576, 1974.

HERZOG, W. Muscle. In: NIGG, B.M.; HERZOG, W. (Eds.). **Biomechanics of the Musculoskeletal System**. Chichester: John Wiley, 1994. p. 154–187.

HIIEMAE, K.; HOUSTON, W. J. B. The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.): I. Their anatomy and internal architecture. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 50, n. 1, p. 75–99, 1971.

HIIEMAE, K.; JENKINS, F. A. The anatomy and internal architecture of the muscles of mastication in *Didelphis marsupialis*. **Postilla**, v. 140, p. 1–49, 1969.

HUXLEY, H. E. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. In: BOURNE, G.H. (Ed.). **The structure and function of muscle**. New York: Academic Press, 1972. p. 301–387.

JUNGERS, W. L.; GERMAN, R. Z. Ontogenetic and interspecific skeletal allometry in nonhuman primates: Bivariate versus multivariate analysis. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 55, n. 2, p. 195–202, jun. 1981.

JURGELSKI, W. The Marsupial as a Biomedical Model. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, n. 6, p. 343–355, 5 nov. 1984.

KIKUCHI, Y.; KURAOKA, A. Differences in muscle dimensional parameters between non-formalin-fixed (freeze-thawed) and formalin-fixed specimen in gorilla (*Gorilla Gorilla*). **Mammal Study**, v. 39, n. 1, p. 65–72, 1 mar. 2014.

KILTIE, R. A. Bite force as a basis for niche differentiation between rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). **Biotropica**, v. 14, n. 3, p. 188–195, set. 1982.

KILTIE, R. A. Size ratios among sympatric neotropical cats. **Oecologia**, v. 61, n. 3, p. 411–416, mar. 1984.

KUHNEN, V. V. et al. Diet overlap and spatial segregation between two neotropical marsupials revealed by multiple analytical approaches. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 1 jul. 2017.

LA CROIX, S. et al. Ontogeny of feeding performance and biomechanics in coyotes. **Journal of Zoology**, v. 285, n. 4, p. 301–315, 8 dez. 2011.

LANGENBACH, G. E. J.; WEIJS, W. A. Growth Patterns of the Rabbit Masticatory Muscles. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 1, p. 20–25, 1990.

LAW, C. J.; YOUNG, C.; MEHTA, R. S. Ontogenetic scaling of theoretical bite force in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 89, n. 5, p. 347–363, 2016.

LEINER, N. O.; SILVA, W. R. Seasonal Variation in the Diet of the Brazilian Slender Opossum (*Marmosops paulensis*) in a Montane Atlantic Forest Area, Southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 1, p. 158–164, 28 fev. 2007.

LEISCHNER, C. L. et al. Scaling of primate forearm muscle architecture as it relates to locomotion and posture. **Anatomical Record**, v. 301, n. 3, p. 484-495, set. 2018.

LEONARD, K. C. et al. Anatomical and ontogenetic influences on muscle density. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LEONARD, K. C. et al. Effects of freezing and short-term fixation on muscle mass, volume, and density. **The Anatomical Record**, v. 305, n. 1, p. 199–208, 1 jan. 2022a.

_____. Effects of long-term ethanol storage on muscle architecture. **The Anatomical Record**, v. 305, n. 1, p. 184–198, 1 jan. 2022b.

LESSA, L. G.; CARVALHO, R. F.; ASTÚA, D. Food Habits of American Marsupials. *In: American and Australasian Marsupials*. [s.l.] Springer International Publishing, 2022. p. 1–28.

LESSA, L. G.; COSTA, F. N. DA. Diet and seed dispersal by five marsupials (Didelphimorphia: Didelphidae) in a Brazilian cerrado reserve. **Mammalian Biology**, v. 75, n. 1, p. 10–16, jan. 2010.

LESSA, L. G.; GEISE, L. Food habits of *Metachirus nudicaudatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a Brazilian Cerrado: Diet composition and dietary seasonality. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 49, n. 2, p. 75–78, 2014.

LUCAS, P. W.; LUKE, D. A. Optimum mouthful for food comminution in human mastication. **Archives of Oral Biology**, v. 29, n. 3, p. 205–210, 1984.

MACEDO, L.; FERNANDEZ, F. A. S.; NESSIMIAN, J. L. Feeding ecology of the marsupial *Philander frenatus* in a fragmented landscape in Southeastern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 75, n. 4, p. 363–369, jul. 2010.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Ontogenetic and Phylogenetic Allometry (Bivariate and Multivariate) for Young Morphologists. **International Journal of Morphology**, v. 37, n. 2, p. 466–472, jun. 2019.

MARCHI, D. et al. Leg muscle architecture in primates and its correlation with locomotion patterns. **Anatomical Record**, v. 301, n. 3, p. 515-527, mar. 2018.

MARROIG, G. et al. The evolution of modularity in the mammalian skull II: Evolutionary consequences. **Evolutionary Biology**, v. 36, p. 136-148, mar. 2009.

MARTIN, M. L. et al. Mechanical similarity across ontogeny of digging muscles in an Australian marsupial (*Isodon fusciventer*). **Journal of Morphology**, v. 280, n. 3, p. 423–435, 1 mar. 2019.

MARTIN, M. L. et al. Review of the methods used for calculating physiological cross-sectional area (PCSA) for ecological questions. **Journal of Morphology**, v. 281, n. 7, p. 778-789, jul. 2020.

MENDEZ, J.; KEYS, A. Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism*, v. 9, p. 184–188, 1960.

MINKOFF, E. C. et al. **American Society of Mammalogists The Facial Musculature of the Opossum (*Didelphis virginiana*)**Source: *Journal of Mammalogy*. [s.l: s.n.].

MISSAGIA, R. V et al. Insectivory leads to functional convergence in a group of Neotropical rodents. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 34, n. 2, p. 391–402, 1 fev. 2021.

MORALES, M. M. et al. Comparative myology of the ankle of *Leopardus wiedii* and *L. geoffroyi* (Carnivora: Felidae): functional consistency with osteology, locomotor habits and hunting in captivity. *Zoology*, v. 126, p. 46–57, 1 fev. 2018.

MUFF, S. et al. Rewriting results sections in the language of evidence. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 37, n. 3, p. 203–210, mar. 2022.

MURPHY, R.; BEARDSLEY, A. Mechanical properties of the cat soleus muscle in situ. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 227, n. 5, p. 1008-1013, nov. 1974.

OISHI, M. et al. Muscle architecture of the upper limb in the orangutan. *Primates*, v. 49, n. 3, p. 204-209, 2008.

PARMENTER, M. D. et al. Masticatory Apparatus Performance and Functional Morphology in the Extremely Large Mice from Gough Island. *Anatomical Record*, v. 303, n. 1, p. 167-179, jan. 2020.

PARREIRA CLARO, H. W.; HANNIBAL, W. Diet of small mammals in semi-deciduous forest fragments in Central Brazil. *Austral Ecology*, v. 47, n. 4, p. 770–774, 1 jun. 2022.

PENROSE, F. et al. Functional morphology of the jaw adductor muscles in the Canidae. *The Anatomical Record*, v. 303, n. 11, p. 2878–2903, 1 nov. 2020.

PERRY, J. M. G. **The anatomy of mastication in extant strepsirrhines and Eocene adapines**. [s.l.] Duke University, 2008.

PERRY, J. M. G.; PRUFROCK, K. A. Muscle functional morphology in Paleobiology: The past, present, and future of “Paleomyology.” *Anatomical Record*, v. 301, n. 3, p. 538-555, mar. 2018.

PERRY, J. M. G.; ST CLAIR E. M.; HARTSTONE-ROSE, A. Craniomandibular signals of diet in adapids. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 158, n. 4, p. 646-662, dez. 2015.

PERRY, J. M. G.; WALL, C. E. Scaling of the Chewing Muscles in Prosimians. *In*: VINYARD, C. J.; RAVOSA, M. J.; WALL, C E (Eds.). . **Primate Craniofacial Function and Biology**. Boston, MA: Springer, 2008. p. 217–240.

PETRIDES, G. A. Sex and Age Determination in the Opossum. *Journal of Mammalogy*, v. 30, n. 4, p. 364–378, 1949.

PFALLER, J. B.; GIGNAC, P. M.; ERICKSON, G. M. Ontogenetic changes in jaw-muscle architecture facilitate durophagy in the turtle *Sternotherus minor*. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 10, p. 1655–1667, 15 maio 2011.

RADINSKY, L. B. **The evolution of vertebrate design**. Chicago & London: University of Chicago Press, 1987.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2018.

RAVOSA, M. J. et al. Masticatory biomechanics and masseter fiber-type plasticity. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 10, n. 1, p. 46-55, 2010.

RAYFIELD, E. J. What does musculoskeletal mechanics tell us about evolution of form and function in vertebrates?. In: BELS, V.; WHISHAW, I. (Eds.). **Feeding in vertebrates: Evolution, morphology, behavior, biomechanics**. Cham: Springer, 2019. p. 45-70.

RAYNE, J.; CRAWFORD, G. N. C. The relationship between fibre length, muscle excursion and jaw movements in the rat. **Archives of Oral Biology**, v. 17, n. 5, p. 859-872, mai. 1972.

REGIDOR, H. A.; GOROSTIAGUE, M. Age determination in the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). **Vida Silvestre Neotropical**, v. 2, n. 2, p. 75–76, 1990.

REGIDOR, H. A.; GOROSTIAGUE, M. Reproduction in the White Eared Opossum (*Didelphis albiventris*) under Temperate Conditions in Argentina. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 31, n. 3–4, p. 133–136, 9 dez. 1996.

RSTUDIO TEAMS. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, PBC, Boston, MA. 2020.

SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R.; SMITH, K. K. Diversity and Evolution of the Marsupial Mandibular Angular Process. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 4, n. 2, p. 119–144, 1997.

SANTANA, S. E. Comparative anatomy of bat jaw musculature via Diffusible Iodine-Based Contrast-Enhanced Computed Tomography. **Anatomical Record**, v. 301, n. 2, p. 267-278, fev. 2018.

SANTANA, S. E.; DUMONT, E. R.; DAVIS, J. L. Mechanics of bite force production and its relationship to diet in bats. **Functional Ecology**, v. 24, p. 776–784, ago. 2010.

SANTORI, R. T. et al. Natural diet at a Restinga forest and laboratory food preferences of the opossum *Philander frenata* in Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 32, n. 1, p. 12–16, 1997.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SCHWENK, K. Tetrapod feeding in the context of vertebrate morphology. In: SCHWENK, K. (Ed.). **Feeding**. Elsevier, 2000. p. 3-20.

SHAHAR, R.; MILGRAM, J. Morphometric and anatomic study of the hind limb of a dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 6, p. 928-933, jun. 2001.

SHI, B. et al. Correlation of skull morphology and bite force in a bird-eating bat (*la io*; Vespertilionidae). **Frontiers in Zoology**, v. 17, n. 8, 19 mar. 2020.

SHIRAI, L. T.; MARROIG, G. Skull modularity in neotropical marsupials and monkeys: Size variation and evolutionary constraint and flexibility. **Journal of Experimental Zoology**, v. 314 B, n. 8, p. 663–683, 15 dez. 2010.

SIBBING, F. Food processing by mastication in cyprinid fish. In: VINCENT, J.; LILLFORD, P. (Eds.). **Feeding and the Texture of Food**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1991. p. 57–92.

SICURO, F. L. et al. Quantifying bite force in coexisting tayassuids and feral suids: a comparison between morphometric functional proxies and *in vivo* measurements. **PeerJ**, v. 9, p. e11948, ago. 2021.

SIDEBOTHAM, E. J. On the Myology of the Water-Opossum. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 53, n. 1, p. 6–22, 31 jan. 1885.

SILVA-NETO, F. DAS C.; PAVAN, S. E.; ASTÚA, D. Evolution, divergence, and convergence in the mandibles of opossums (Didelphidae, Didelphimorphia). **Current Zoology**, v. zoad027, 26 jun. 2023.

SINCLAIR, A. G.; ALEXANDER, R. M. Estimates of forces exerted by the jaw muscles of some reptiles. **Journal of Zoology**, v. 213, n. 1, p. 107-115, set. 1987.

SINGLETON, M. Functional Geometric Morphometric Analysis of Masticatory System Ontogeny in Papionin Primates. **The Anatomical Record**, v. 298, n. 1, p. 48–63, 1 jan. 2015.

SMITH, K. K.; KEYTE, A. L. Adaptations of the Marsupial Newborn: Birth as an Extreme Environment. **The Anatomical Record**, v. 303, n. 2, p. 235–249, 1 fev. 2020.

SMITH, K. K.; REDFORD, K. H. The anatomy and function of the feeding apparatus in two armadillos (Dasypoda): Anatomy is not destiny. **Journal of Zoology**, v. 222, n. 1, p. 27-47, set. 1990.

STANCHAK, K. E.; FAURE, P. A.; SANTANA, S. E. Ontogeny of cranial musculoskeletal anatomy and its relationship to allometric increase in bite force in an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). **The Anatomical Record**, p. 1–11, 2023.

SWIDERSKI, D. L.; ZELDITCH, M. L. Morphological diversity despite isometric scaling of lever arms. **Evolutionary Biology**, v. 37, p. 1–18, mar. 2010.

TANNER, J. B. et al. Ontogenetic change in skull morphology and mechanical advantage in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). **Journal of Morphology**, v. 271, n. 3, p. 353–365, mar. 2009.

TAVERNE, M. et al. Convergence in the functional properties of forelimb muscles in carnivorans: adaptations to an arboreal lifestyle?. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 125, n. 2, p. 250-263, ago. 2018.

TAYLOR, A. B. et al. Jaw-Muscle Fiber Architecture and Leverage in the Hard-Object Feeding Sooty Mangabey are not Structured to Facilitate Relatively Large Bite Forces Compared to Other Papionins. **The Anatomical Record**, v. 301, p. 325–342, 13 fev. 2018.

TAYLOR, A. B.; VINYARD, C. J. In situ fiber length estimates from sectioned muscle bellies are not systematically shorter compared with fiber length estimates obtained using chemical digestion. **The FASEB Journal**, v. 34, n. S1, p. 1-1, abr. 2020.

THEXTON, A. J.; HIIEMAE, K. M. The twitch-contraction characteristics of opossum jaw musculature. **Archives of Oral Biology**, v. 20, n. 11, p. 743–748, nov. 1975.

THIELEN, D. R. et al. Food availability and population dynamics of *Marmosa xerophila* Handley and Gordon 1979 (Marsupialia: Didelphidae). **Zoocriaderos**, v. 2, p. 1–15, 1997.

THOMASON, J. J. Cranial strength in relation to estimated biting forces in some mammals. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 9, p. 2326–2333, set. 1991.

THOMASON, J. J.; RUSSELL, A. P.; MORGELI, M. Forces of biting, body size, and masticatory muscle tension in the opossum *Didelphis virginiana*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, n. 2, p. 318–324, 1 fev. 1990.

THOMPSON, E. N.; BIKNEVICIUS, A. R.; GERMAN, R. Z. Ontogeny of feeding function in the gray short-tailed opossum *Monodelphis domestica*: empirical support for the constrained model of jaw biomechanics. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 5, p. 923–932, mar. 2003.

TURNBULL, W. D. **Mammalian masticatory apparatus**. [s.l.] Fieldiana: Geology, 1970. v. 18, n. 2.

VAN NIEVELT, A. F. H.; SMITH, K. K. Tooth Eruption in *Monodelphis domestica* and Its Significance for Phylogeny and Natural History. **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 333–341, abr. 2005.

VERWAIJEN, D.; DAMME, R. VAN; HERREL, A. Relationships between head size, bite force, prey handling efficiency and diet in two sympatric lacertid lizards. **Functional Ecology**, v. 16, n. 6, p. 842–850, 2002.

VICKERTON, P.; JARVIS, J.; JEFFERY, N. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. **Journal of Anatomy**, v. 223, n. 2, p. 185–193, ago. 2013.

VIEIRA, E. M.; ASTÚA, D. Carnivory and insectivory in Neotropical marsupials. In: MENNA, J.; DICKMAN, C.; ARCHER, M. (Eds.). **Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p. 271–284.

VIEIRA, E. M.; ASTÚA DE MORAES, D. Carnivory and insectivory in Neotropical marsupials. In: JONES, M.; DICKMAN, C.; ARCHER, M. (Eds.). **Predators with pouches: The Biology of Carnivorous Marsupials**. Australia: CSIRO Publishing, 2003. p. 271–284.

VINYARD, C. J.; TAYLOR, A. B. A preliminary analysis of the relationship between jaw-muscle architecture and jaw-muscle electromyography during chewing across primates. **The Anatomical Record**, v. 293, n. 4, p. 572–582, abr. 2010.

VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 322, p. 1–177, 2009.

VOSS, R. S.; JANSA, S. A. **Opossums: an adaptive radiation of new world marsupials**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2021.

WARBURTON, N. M. Comparative jaw muscle anatomy in kangaroos, wallabies, and rat-kangaroos (Marsupialia: Macropodoidea). **The Anatomical Record**, v. 292, n. 6, p. 875–884, 2009.

WARBURTON, N. M. et al. Adaptations for digging in the forelimb muscle anatomy of the southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) and bilby (*Macrotis lagotis*). **Australian Journal of Zoology**, v. 61, n. 5, p. 402–419, 2013.

WARBURTON, N. M.; YAKOVLEFF, M.; MALRIC, A. Anatomical adaptations of the hind limb musculature of tree-kangaroos for arboreal locomotion (Marsupialia: Macropodinae). **Australian Journal of Zoology**, v. 60, n. 4, p. 246–258, 2012.

WARD, S. R.; LIEBER, R. L. Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. **Journal of Biomechanics**, v. 38, n. 11, p. 2317–2320, nov. 2005.

WEIJS, W. A. Evolutionary Approach of Masticatory Motor Patterns in Mammals. In: BELS, V. L.; CHARDON, P.; VANDERWALLE, P. (Eds.). **Biomechanics of Feeding in Vertebrates. Advances in Comparative and Environmental Physiology**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1994. v. 18. p. 281–320.

WEIJS, W. A.; HILLEN B. Cross-sectional areas and estimated intrinsic strength of the human jaw muscles. **Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica**, v. 23, p. 267–274, 1985.

WEIJS, W. A.; BRUGMAN, P.; KLOK, E. M. The growth of the skull and jaw muscles and its functional consequences in the New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of Morphology**, v. 194, n. 2, p. 143–161, nov. 1987.

WIBLE, J. R. On the cranial osteology of the short-tailed opossum *Monodelphis brevicaudata* (Didelphidae, Marsupialia). **Annals of the Carnegie Museum**, v. 72, n. 3, p. 137–202, 2003.

7. APÉNDICE



Técnicas para o estudo da musculatura em pequenos mamíferos: dissecação clássica e cálculo da área de secção transversal fisiológica (PCSA)

Juann Aryell Francisco de Holanda Abreu¹, Gabby Neves Guilhon², Diego Astúa^{1*}

¹ Laboratório de Mastozoologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

² Laboratório de Mastozoologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

* Autor para correspondência: diego.astua@ufpe.br

Resumo: A dissecação possibilita a coleta de dados anatômicos e funcionais de grupos musculares, e constitui uma das técnicas clássicas que permitem entender a forma e função dos mamíferos. A adição de novas técnicas à dissecação fornece mais informações em que funções podem ser estimadas através de dados morfológicos. Características musculares como locais de origem e inserção, tamanho do ventre e arquitetura interna podem corresponder ao desempenho de comportamentos, especialmente quando diferentes ou especializados. A capacidade dos músculos de se estender, de produzir força, ou quão rápido se contraem, está associada à arquitetura de fibra. As fibras musculares estão organizadas nos fascículos e o arranjo dos fascículos dentro do músculo influencia seu comprimento e a quantidade. Quanto maior o número de fibras no músculo, maior a sua capacidade de produção de força. A área de secção transversal fisiológica (PCSA) é uma medida proporcional à força muscular pois representa a quantidade de fibras. Nosso objetivo é apresentar métodos acessíveis associados a dissecação muscular clássica para medição dos fascículos musculares e estimativa da PCSA. Com essas técnicas e a possibilidade de amostragens amplas em coleções e museus científicos, ou mesmo na recepção de novos espécimes que podem representar oportunidades únicas, esperamos ajudar e aumentar o interesse de pesquisadores em explorar os músculos através de uma combinação de estimativas que contribuem para a compreensão da evolução morfológica e funcional dos mamíferos.

Palavras-Chave: Anatomia; Dissecação; Miologia; Morfologia; Musculatura.

Abstract: Techniques for muscle dissections in small mammals: classic dissection and physiological cross-section area (PCSA) calculations. Dissections allow the data collection of functional and anatomical features of muscle groups and are one of the classical approaches for understanding form and function in mammals. New dissection techniques provide more information on which functions can be estimated through morphological data. Muscle features such as origin and insertion attachments, belly size, and internal architecture can correspond to performance of behaviors, especially when are different or specialized. Fiber architecture is associated with the muscles' ability to extend and produce force or how fast they contract. Muscle fibers are organized in fascicles, and fascicle arrangements within the muscle influence their length and quantity. The greater the number of muscle fibers, the greater its ability to produce force. The physiological cross-sectional area (PCSA) is a measure proportional to muscle force due to its representation of fiber quantity. Our goal is to present accessible methods associated with classical muscle dissection for measuring muscle fascicles and estimating PCSA. With these techniques and the possibility of extensive sampling in scientific collections and museums or through the collection of new specimens that may represent unique opportunities, we hope that this manuscript might help and interest researchers in exploring muscle data through a combination of estimates that contribute to the understanding of the morphological and functional evolution of the mammals.

Keywords: Anatomy; Dissection; Morphology; Musculature; Myology.

INTRODUÇÃO

O estudo das relações entre a forma dos organismos e sua função é antigo, e tem sido uma das bases da biologia evolutiva nas últimas décadas (Bels & Herrel, 2019; Rayfield, 2019; Santana *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2016). Ecomorfologistas e morfologistas funcionais se interessam por essas associações (Aerts *et al.*, 2002; Diogo, 2017), principalmente quando aplicadas às estruturas que conferem o desempenho de tarefas ecológicas importantes como comer ou se locomover. Exemplos disso são os esforços para identificar a relação entre a morfologia do aparato alimentar e dieta (Missagia *et al.*,

2021; Smith & Redford, 1990) ou da morfologia dos membros com o modo locomotor (Marchi *et al.*, 2018; Taverne *et al.*, 2018), relacionadas a funções como morder e andar, respectivamente. No entanto, o que o animal faz (*i.e.*, comportamento) ou o quanto ele pode fazer (*i.e.*, desempenho), é limitado pela morfologia (Garland & Losos, 1994; Rayfield, 2019). Essa relação entre a variação morfológica e traços relevantes de desempenho é habitualmente investigada pela morfometria, conforme dimensões ósseas são assumidas como preditoras funcionais para a morfologia musculoesquelética. Contudo, as capacidades funcionais dos músculos podem ser melhor compreendidas com a anatomia e estrutura interna



(Leonard *et al.*, 2022b). As áreas de fixação, tamanho, arranjo e até a composição do tipo das fibras musculares são determinantes fundamentais, já que correspondem potencialmente a fatores críticos de desempenho (Hartstone-Rose *et al.*, 2019; Ravosa *et al.*, 2010).

A relação funcional de aspectos da musculatura, como a variação da massa relativa de músculos individuais, dos locais de fixação, ou estrutura interna, vem sendo abordada com algum detalhe desde a metade do século passado (Davis, 1955; 1964; Herring, 1972; Herring & Herring, 1974; Kiltie, 1982; 1984; Turnbull, 1970). Antes da notável (ou heróica; Herring, 1993) revisão de Turnbull (1970) do aparato mastigatório de mamíferos, Davis (1955, 1964) os utiliza na comparação da musculatura mastigatória de carnívoros e aborda as diferenças na secção transversal das fibras musculares (atual área de secção transversal fisiológica) na extensão da força muscular. Essa área de secção transversal fisiológica (do inglês *physiological cross-sectional area*, ou PCSA) de um músculo se refere ao somatório das secções transversais das fibras musculares individuais (Marchi *et al.*, 2018; Vinyard & Taylor, 2010). A PCSA é diferente da área de secção transversal anatômica, que é medida perpendicular ao eixo longitudinal do músculo e não considera a orientação das fibras (Figura 1A-B) (Leischner *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018). A PCSA representa

uma métrica proporcional à produção de força muscular isométrica máxima pois reflete o maior número de fibras que exerceriam tensão por unidade de volume muscular (Dickinson & Hartstone-Rose, 2023; Leonard *et al.*, 2021; 2022a; Martin *et al.*, 2019; 2020). Em resumo, quanto maior a PCSA, mais fibras estariam contidas no músculo e, consequentemente, a capacidade de produção de força muscular é maior. Diversos estudos vêm utilizando essa propriedade muscular para inferências morfofuncionais em mamíferos: abordagens com músculos mastigatórios tem investigado a relação com a capacidade de animais consumirem alimentos mecanicamente resistentes (Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2019; 2022) ou quanto a morfologia dos músculos dos membros descreve a interação com o substrato (Dickinson & Hartstone-Rose, 2023; Marchi *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2019).

É muito difícil realizar a medição direta da PCSA em todos os músculos. Tentativas de estimar a PCSA da estrutura óssea foram aplicadas em especial no aparato mastigatório (Figura 1C-E) e embora possa ser relativamente bem estimada para os músculos mastigatórios pelo método de Thomason (Dickinson *et al.*, 2021; Penrose *et al.*, 2020; Thomason, 1991), outras informações musculares influenciam a variação do desempenho. Tanto o tamanho do músculo quanto das fibras musculares são importantes, já que a magnitude da força que

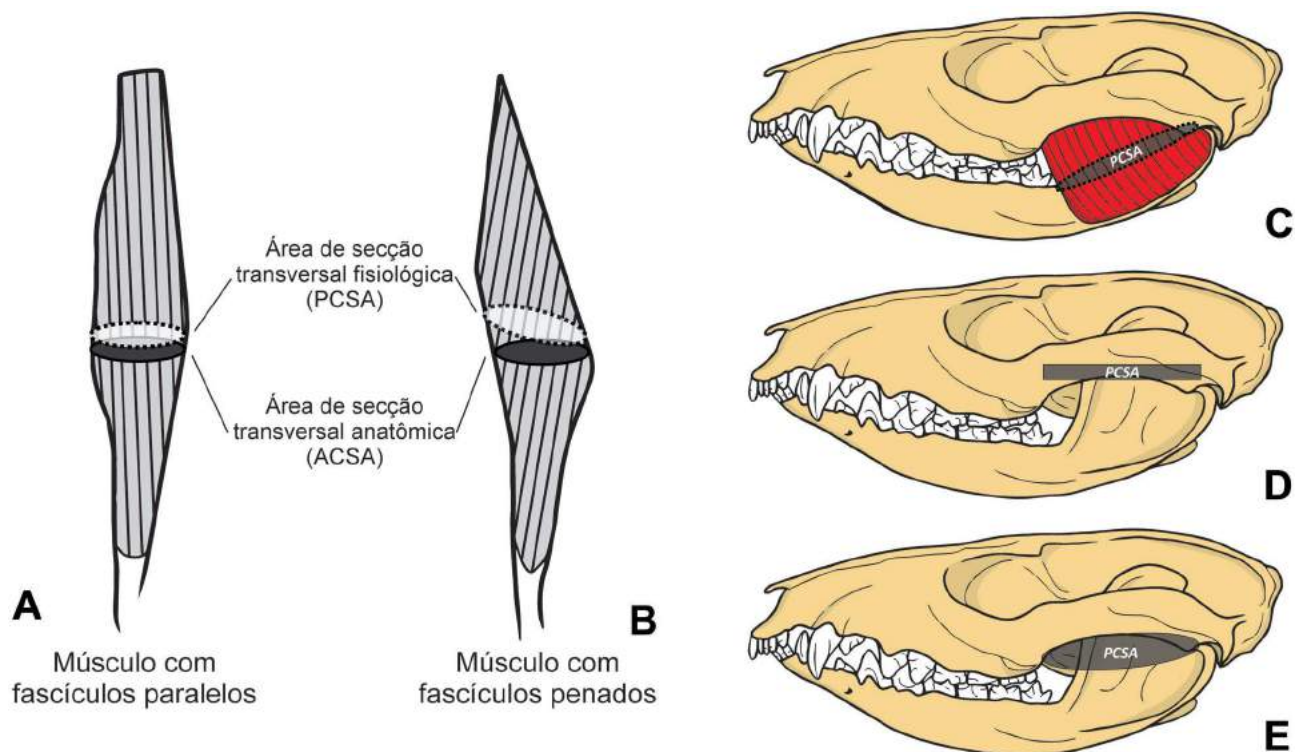


Figura 1: Representação de músculos com fascículos paralelos (A) e penados (B), e das áreas de secção transversal fisiológica (PCSA) e anatômica (ACSA) em cada músculo; e aproximações da PCSA (área sombreada) do *m. masseter* de *Didelphis albiventris* (C) usando medições osteológicas no crânio (D-E). A e B: a ACSA é medida perpendicular ao eixo longitudinal do músculo e é igual a PCSA em A, mas não considera a mudança na orientação dos fascículos em B, diferente da PCSA. Os fascículos mais curtos estão em maior quantidade em B e resultam numa PCSA maior. C-E: um método simples usado por Kiltie (1982, 1984) calcula a área de um retângulo que abrange comprimento e largura da origem do músculo no crânio (D). O método de Thomason (1991) ou de crânio seco (*dry skull*) usa a área preenchida pelo músculo no crânio. A área do *m. masseter* é combinada com a do *m. pterygoideus medialis* e medida na visão ventral, aqui ilustrada na visão lateral (E). Maiores detalhes podem ser obtidos nas descrições originais.



um músculo pode produzir depende da quantidade de fibras dentro dele (Dickinson & Hartstone-Rose, 2023). Músculos maiores tendem a conter um maior número de fibras, ao mesmo tempo em que fibras menores estão em maior número em um mesmo volume muscular (Figura 2A). A relação da PCSA com o volume muscular e com o comprimento de fibra é expressa como:

$$PCSA = \frac{v}{cf} \text{ ou } \frac{m}{\rho \times cf}$$

onde v é o volume muscular (cm^3), cf é o comprimento médio da fibra muscular (cm), m é a massa do músculo (g), e ρ é a densidade do músculo ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$); PCSA em cm^2 . Como as fibras não ocorrem de maneira individualizada

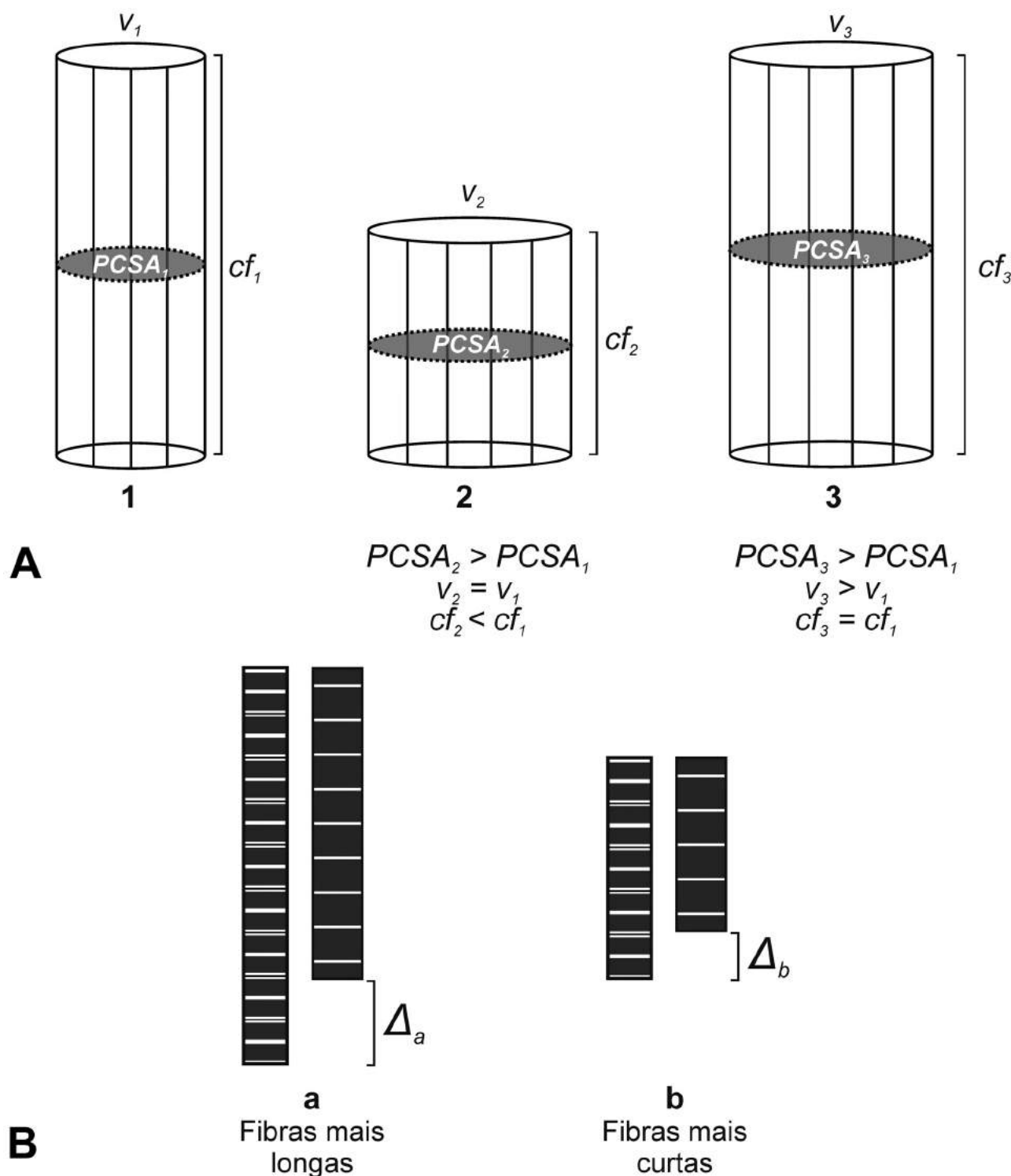


Figura 2: Representação de como o volume e comprimento dos fascículos podem modificar características do músculo (representado pelo cilindro), como a PCSA e a velocidade de contração. A: A PCSA (área sombreada) aumenta com o menor comprimento dos fascículos (situação 2) ou maior volume do músculo (situação 3). B: Fibras mais longas (a) se estendem e contraem mais do que fibras mais curtas (b) ($\Delta_a > \Delta_b$) ao mesmo tempo, ou seja, são mais rápidas.



dentro dos músculos (*i.e.*, agrupadas em fascículos que, subsequentemente, formam os ventres musculares), seu comprimento é usualmente medido através dos fascículos, como *cf* será referido daqui para frente.

Os músculos que possuem algum tipo de penação (unipenados, bipenados ou multipenados) apresentam fascículos que se inserem a um ângulo nos tendões (Anapol & Barry, 1996). Os fascículos têm seu comprimento reduzido nesses músculos e, com isso, a PCSA é aprimorada (Figura 1A-B). Já os fascículos paralelos são geralmente mais longos e relacionados ao quanto o músculo pode se estender e a velocidade de sua contração (Leischner *et al.*, 2018; Leonard *et al.*, 2022a). Os sarcômeros (as menores unidades funcionais da contração muscular) estruturados serialmente e em maior quantidade nos fascículos longos, possibilitam uma excursão muscular relativamente maior e uma contração muscular mais rápida quando comparado com músculos de dimensões equivalentes (Figura 2B) (Dickinson & Hartstone-Rose, 2023; Leonard *et al.*, 2022b; Marchi *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2019; 2020; Taverne *et al.*, 2018). Contudo, alongar as fibras implica em uma PCSA menor. Essa troca funcional descrita pela arquitetura de fibra ou muscular (Anapol & Barry, 1996; Dickinson & Hartstone-Rose, 2023; Perry & Prufrock, 2018; Vinyard & Taylor, 2010) altera a capacidade do músculo de produção de força, extensão e velocidade de contração. Estudos de morfologia funcional miológica de diversos grupos têm contrastado a importância desta variação (Dickinson & Hartstone-Rose, 2023; Leischner *et al.*, 2018).

A determinação da massa, comprimento dos fascículos musculares e da penação dependem da dissecação de espécimes, realizada de maneira física (na sua forma clássica) ou digital. A dissecação digital é feita através do escaneamento do espécime (ou da parte corpórea de interesse) por meio da tomografia computadorizada (*CT scan*, do inglês *Computed Tomography scan*). É usado um agente de coloração (solução de iodo) para dar contraste ao músculo e permitir sua visualização após o escaneamento e reconstrução digital tridimensional do espécime. O uso da tomografia computadorizada com contraste à base de iodo difusível, ou simplesmente *DiceCT* (do inglês *Diffusible iodine-based contrast-enhanced Computed Tomography*), têm se tornado cada vez mais comum no estudo da anatomia muscular dos mamíferos (Dickinson *et al.*, 2018; 2019; Hartstone-Rose & Dickinson, 2022; Santana, 2018). Essa técnica permite a observação anatômica *in situ* dos músculos e a quantificação de parâmetros musculares sem que ocorra a destruição dos músculos, como eventualmente acontece com a dissecação manual (Dickinson *et al.*, 2018). No entanto, a dissecação digital não está acessível a todos os pesquisadores. A tomografia requer um maquinário específico e altamente custoso para adquirir e realizar manutenções casuais, além do treinamento de profissionais qualificados para seu uso (Ford *et al.*, 2023; Martin *et al.*, 2020).

O uso se torna ainda mais dispendioso, e talvez inviável, dependendo do tamanho do espécime e do tomógrafo disponível (Böhmer *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2020).

Por outro lado, as disseções anatômicas clássicas ou físicas apresentam um custo menor, fornecem dados qualitativos e quantitativos de qualidade (Böhmer *et al.*, 2020; Souza Junior *et al.*, 2018), e possuem resultados taxonomicamente amplos acumulados de séculos na literatura para a análise comparativa (apesar de, evidentemente, incorrerem na destruição parcial do espécime). Estudos com os músculos mastigatórios e dos membros locomotores são mais frequentes e têm demonstrado a diversidade da anatomia muscular e suas relações funcionais dentro dos mamíferos, embora permaneçam subexplorados em diversos táxons. Mesmo que muitos grupos de mamíferos ou músculos (*e.g.*, musculatura axial) ainda não tenham sido adequadamente estudados, há uma grande dificuldade no estudo muscular em obter amostras diversas e adequadas (Souza Junior *et al.*, 2018). O acesso a espécimes apropriados representa muitas vezes uma oportunidade única (Morales *et al.*, 2018) e deve ser aproveitada para coletar o quanto de informação possível. Com isso e a possibilidade de amostragens amplas em coleções e museus científicos, este ensaio reúne técnicas existentes na literatura aliadas a dissecação muscular clássica para medição dos fascículos musculares e estimativa da PCSA.

Os métodos podem ser divididos nas seguintes etapas: 1. dissecação; 2. obtenção do comprimento dos fascículos e; 3. estimativa da PCSA.

DISSECAÇÃO

A dissecação é um procedimento considerado comum no estudo de mamíferos pela constante necessidade de taxidermizar os espécimes, seja de forma seriada para acondicionamento em coleção, ou de forma expositiva para as galerias de museu. Apesar disso, a carcaça muscular é usualmente inutilizada ao colocar os espécimes para limpeza do esqueleto em dermestério. Incentivamos aqui o retorno dos estudos anatômicos clássicos que não só permitiria ampliar o conhecimento miológico de diversos mamíferos, como também evitaria a perda deste material quando os espécimes são depositados na coleção de forma seca.

Os equipamentos são familiares à taxidermia: cabos de bisturi de número 3 e 4 para o uso de lâminas grandes e pequenas, e pinças, em especial de ponta regular arredondada e ponta fina; outras como ponta dente de rato e ponta romba podem ser úteis para partes mais resistentes. A depender do tamanho do espécime, alfinetes ou agulhas de diferentes calibres podem ajudar na separação e exposição dos músculos (Figura 3A). Ter soro fisiológico à disposição também é útil para manter os espécimes hidratados durante a dissecação, principalmente os que estavam preservados em álcool.

A dissecação de espécimes frescos ou depositados no álcool tem suas vantagens e desvantagens. No caso de espécimes frescos, os músculos estarão menos rígidos, possivelmente com aspecto gelatinoso, o que pode facilitar o manuseio e evitar o rompimento acidental dos ventres e fascículos musculares, embora deixe a visualização dos limites musculares mais difícil para o olho menos treinado. Já o material preservado por um tempo no álcool (etanol 70%), como comumente ocorre nas coleções mastozoológicas, já estará desidratado e ressecará rapidamente durante a dissecação, necessitando de mais hidratação com soro fisiológico do que o espécime fresco. O excesso de ressecamento torna o material frágil e os fascículos musculares podem se quebrar com facilidade. Apesar disso, o ressecamento tem a vantagem de delimitar e evidenciar os limites musculares, os tendões, as fâscias e o tecido conjuntivo de forma mais óbvia do que no material fresco.

Na remoção da pele da região de interesse, caso o espécime não tenha sido taxidermizado previamente (guias sugeridos: Auricchio & Salomão, 2002; De Iuliis & Pulerà, 2019), não é recomendado o bisturi pois pode danificar os músculos facilmente. Também é necessária uma atenção especial aos músculos que são aderidos na pele, tanto na cabeça quanto nos membros. Se preciso, use pinças para segurar o tecido conjuntivo e retirá-lo cuidadosamente para expor completamente os músculos desejados.

Durante a dissecação, notas detalhadas sobre as características da inserção e a localização dos músculos, somadas a fotografias tomadas em cada etapa do procedimento e em diversos planos anatômicos, são úteis mais à frente para identificação e descrição da anatomia

muscular. Em especial, as inserções dos músculos nos ossos, tanto a origem quanto a inserção, são variações morfológicas que mudam sutilmente entre espécies e geralmente estão associadas a aspectos cinemáticos e biomecânicos de um comportamento. O uso de referências anatômicas deve auxiliar na delimitação das inserções. Uma metodologia muito eficiente e que não causa danos permanentes ao material ósseo é, logo após a remoção do músculo, pintar as inserções musculares com lápis-de-cor aquareláveis (Figura 3B). Além de facilitar a posterior identificação das inserções musculares, as marcações podem ser facilmente removidas do osso com água (A. Piancastelli, *com. pess.*). Também podemos envolver o osso, ou fotografias de visões diferentes do osso, com papel filme e fazer as marcações por cima (Fisher *et al.*, 2008).

Reter informações visuais sobre as inserções musculares é essencial para a criação da imagem de mapeamento dos músculos nos ossos (Figura 3C). A presença da régua na foto é indispensável para a produção da escala e também possibilita a medição correta do comprimento do ventre muscular, do fascículo muscular e do tendão (Figura 4A-B), quando possível, independentemente do *zoom* utilizado em cada foto.

OBTENÇÃO DO COMPRIMENTO DOS FASCÍCULOS

A fibra muscular pode ser medida diretamente no músculo (Oishi *et al.*, 2008; Penrose *et al.*, 2020). Inicialmente, o comprimento do músculo foi utilizado como uma medida ao menos sugestiva para o comprimento da fibra, mesmo que nem sempre seja verdade (Herring,

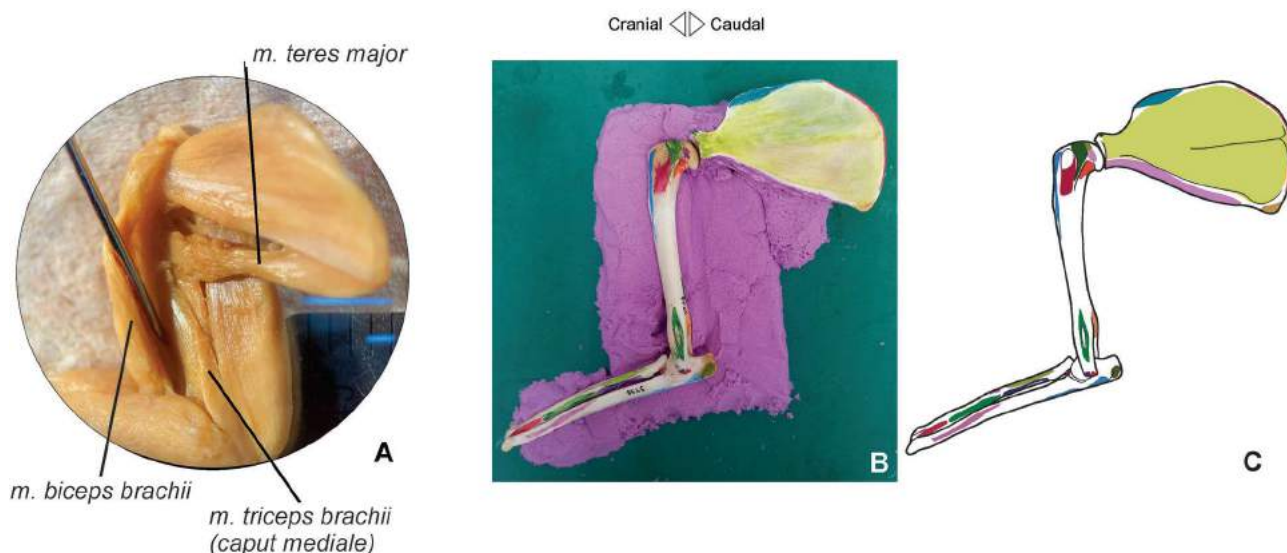


Figura 3: Dissecação do membro torácico do marsupial *Lestoros inca* através de um estereomicroscópio (A) e parte do esqueleto do membro torácico do gato mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) com as inserções musculares pintadas com lápis-de-cor aquarelável (B) e ilustradas (C), todos em visão medial. Em A, podemos reconhecer as regiões escapular, do ombro, do braço e parte do antebraço, encobertos por músculos do membro torácico. Neste caso, os músculos extrínsecos do braço já foram removidos, e inicia-se a separação e identificação dos músculos intrínsecos do braço. A agulha à esquerda separa o *m. biceps brachii*, permitindo também uma melhor visualização dos detalhes da inserção *m. teres major* e do *m. triceps brachii caput mediale*. A: Foto de Gabby Guilhon, espécime FMNH 172050. B e C: Foto e estudo conduzido por Ashtari Piancastelli, espécime UFMG 3938.

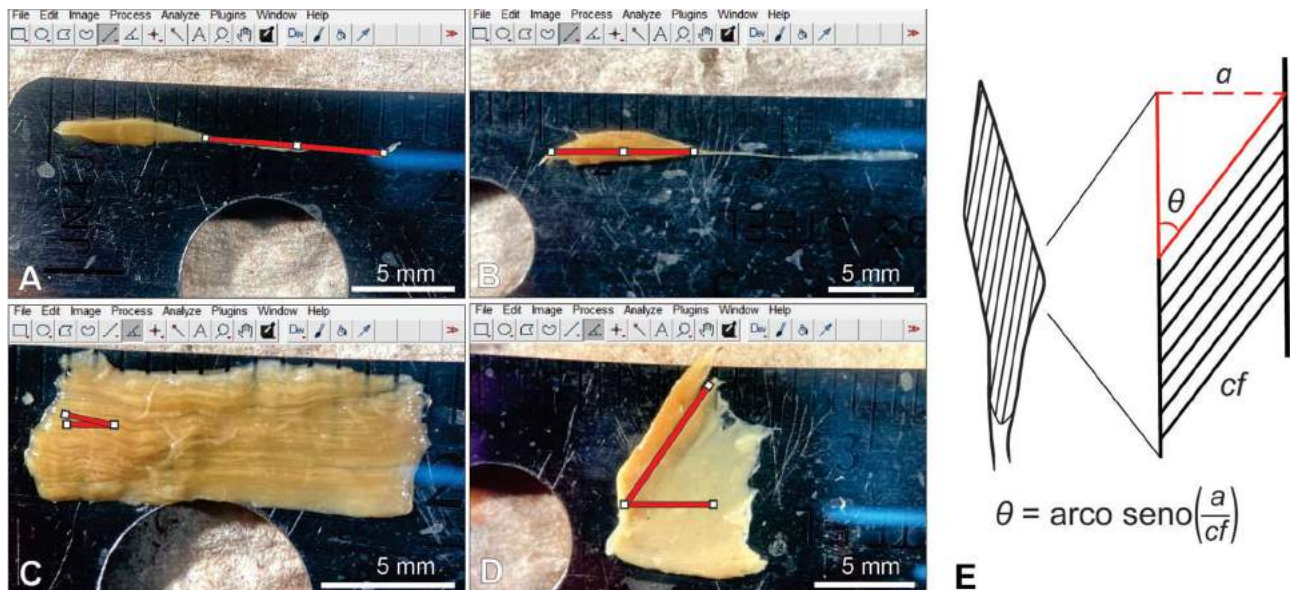


Figura 4. A-D: Medições de características musculares no *software* ImageJ: comprimento do tendão muscular (A); fascículos medidos diretamente no ventre muscular (B); e o ângulo de penetração que leva em consideração a linha de ação do músculo em fascículos paralelos (C) e penados (D). Fotos de Gabby Guilhon. E: Variáveis usadas na estimativa do ângulo de penetração (θ), onde a é a distância perpendicular da linha de ação (ou tendão) à extremidade da fibra no ventre muscular; cf , o comprimento do fascículo.

1972; Martin *et al.*, 2020). Essas medições supõem uma fibra central dentro do músculo que percorre todo comprimento muscular, tirada entre o ponto médio da origem e inserção. Entretanto, quando medidas representativas do comprimento muscular foram usadas com músculos mastigatórios (Langenbach & Weijs, 1990; Perry *et al.*, 2015), não mostraram ser bem explicativas – o arranjo interno dos fascículos no músculo influencia o comprimento. A variação do tamanho dos fascículos também pode gerar confusão. Fascículos superficiais são evitados (Kikuchi & Kuraoka, 2014; Martin *et al.*, 2019) pois tendem a ter comprimentos distintos que sozinhos impediriam que toda a diversidade de comprimentos de fibra seja capturada. É necessário garantir que todas as regiões do músculo estejam representadas. Alguns estudos contornam isso realizando secções ao longo do comprimento do músculo ou orientação dos fascículos para medi-los nas diferentes partes (Crook *et al.*, 2008; Vinyard & Taylor, 2010). Fazer incisões para medição dos fascículos é um dos métodos recomendados por Martin *et al.* (2020). Contudo, dependendo do corte e arquitetura de fibra (*i.e.*, músculos penados), há o risco das fibras expostas não estarem intactas, o que resultaria em medições bem mais curtas que a realidade. Mesmo que Taylor & Vinyard (2020) apontem que não há suporte empírico para isso, seria difícil aplicá-lo em músculos pequenos (Martin *et al.*, 2020).

O uso da digestão química para a separação dos fascículos é mais recomendado para espécimes pequenos, e tem sido mais comumente utilizado na literatura. Nesse método, os músculos são submersos em soluções aquosas de ácido até a desintegração do tecido conectivo (Martin *et al.*, 2020). Dois ácidos são comumente usados: o ácido nítrico (entre 10-35%) e o

ácido sulfúrico (entre 10-20%). O ácido acético (vinagre branco) também parece fornecer resultados equivalentes segundo Leischner *et al.* (2018). Antes de submergir os músculos no ácido, é necessário remover o excesso de gordura, quando presente, além de tendões externos substanciais (Leonard *et al.*, 2022a; Souza Junior *et al.*, 2018). Os tendões são cortados no nível a qual os fascículos fixam sobre ele (Leischner *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018). Essa prática não é necessária em músculos que possuem inserções carnosas, como acontece com os músculos mastigatórios (Leonard *et al.*, 2022a). Quando colocados no ácido, o procedimento difere levemente entre o ácido nítrico e o sulfúrico, já que os músculos no ácido sulfúrico são frequentemente aquecidos (cozinhados) entre 60-70°C, embora não seja obrigatório (Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2019; 2022; Leischner *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018; Rayne & Crawford, 1972; Souza Junior *et al.*, 2018). Em todos, o tempo no ácido deve ser monitorado integralmente. Os músculos podem mudar de forma e o nível do ácido terá que ser reajustado se necessário (Marchi *et al.*, 2018). Depois, os músculos são mantidos até que os fascículos sejam facilmente separados, que na desatenção mínima, pode levar a uma digestão excessiva do ácido e a desintegração das fibras. O tempo de digestão varia quanto à concentração do ácido, características do músculo (tamanho, espessura, área de superfície, quantidade de tecido conectivo) e preservação (se retirados frescos ou desidratados de espécimes fixados com formol e/ou depositados em álcool). A influência das características musculares foi verificada em observações próprias (J. Abreu) com diferentes estágios ontogenéticos de *Didelphis albiventris*. A ação do ácido nítrico (30%) nos músculos mastigatórios de espécimes



filhotes foi bem mais vagarosa (permanecendo até três dias no ácido) do que em subadultos e adultos (Abdala *et al.*, 2001) que demonstraram uma ação excessiva em poucas horas (~2-3 h) quando observado. Recentemente, temos utilizado o ácido sulfúrico (10%) aquecido a 60°C na separação das fibras dos músculos mastigatórios de diferentes didelfídeos que têm sido retirados em 20 min-1 h. O tempo em geral é mantido por outros estudos por ao menos algumas horas, mas os músculos podem ficar até 10 dias no ácido (Souza Junior *et al.*, 2018).

Após o ácido, os músculos devem ser manipulados com cuidado para evitar a quebra das fibras. Eles são secados ou enxaguados e transferidos para uma solução aquosa de glicerina (comumente 50%; Martin *et al.*, 2019, usam a 30%) até a separação das fibras. O comprimento médio dos fascículos é obtido ao selecionar aleatoriamente um conjunto de fascículos de diferentes regiões do músculo (Leischner *et al.*, 2018). Um instrumento com menor risco cortante pode ser usado para manusear os músculos e auxiliar na separação cuidadosa das fibras, como uma pinça ou agulha de ponta romba que devem servir melhor dependendo do tamanho do músculo (Herrel *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2019). O uso de lupa auxilia substancialmente na separação das fibras de pequenos músculos. Remover as fibras com os músculos ainda molhados com a glicerina também foi particularmente mais exitoso. A quantidade de fascículos tem sido variável entre os trabalhos e até entre os músculos de um mesmo trabalho, mas é geralmente acima de 10. Os fascículos são medidos diretamente por uma fita métrica, paquímetro ou através de um *software* de visualização de imagens quando fotografadas com escala. O último é mais conveniente para músculos menores e o *software* gratuito ImageJ é frequentemente usado no processamento das imagens.

A média dos comprimentos já pode ser utilizada no cálculo da PCSA de músculos individuais ou para complexos musculares quando são removidos juntos ("em bloco"; Leonard *et al.*, 2022b). Por exemplo, músculos adutores da mandíbula (*e.g.*, masseter) se subdividem em camadas ou porções que podem se misturar às adjacentes e tornar a separação difícil (Hartstone-Rose *et al.*, 2019). A baixa diferenciação não sugere que os fascículos estão submetidos a demandas funcionais muito distintas que, de outra forma, correria o risco de o comprimento médio ser pouco representativo funcionalmente. Já o comprimento médio dos fascículos de diferentes camadas ou grupos musculares pode ser estimado com uma média ponderada. Hartstone-Rose *et al.* (2012; 2018; 2019; 2022) calculam adicionalmente o comprimento do fascículo médio dos adutores da mandíbula escalonando o comprimento do fascículo de cada músculo à massa muscular do músculo.

$$CF_{\text{médio}} = \frac{cf_{TP} \times m_{TP} + cf_{MS} \times m_{MS} + cf_{PT} \times m_{PT}}{m_{TP} + m_{MS} + m_{PT}}$$

onde *cf* é a média do comprimento do fascículo para os músculos adutores da mandíbula (*TP*, *m. temporalis*; *MS*, *m. masseter*; *PT*, *m. pterygoideus*) e *m* é a massa.

O comprimento médio do fascículo também pode ser corrigido para representar um comprimento ótimo e padronizado do sarcômero para produção de força (Anapol & Barry, 1996; Taylor *et al.*, 2018; Vinyard & Taylor, 2010). Músculos se contraem e produzem tensão através dos sarcômeros, que correspondem às unidades que geram força na fibra muscular. A tensão gerada depende das interações entre filamentos de actina e miosina. O grau de sobreposição entre elas determina o comprimento do sarcômero. A relação entre o comprimento do sarcômero e a tensão gerada produz uma curva que tem seu pico próximo do comprimento de repouso do sarcômero. Alguns estudos ajustam o comprimento da fibra para considerar o comprimento teórico do sarcômero em repouso (2,3-2,8 µm; Huxley, 1972) e controlar as diferenças de músculos fixados em diferentes graus de excursão e posturas (Anapol & Barry, 1996; Taylor *et al.*, 2018; Vinyard & Taylor, 2010). Contudo, Hartstone-Rose *et al.* (2018) consideram essa modificação teoricamente problemática. Todas as fibras corrigidas simultaneamente de diferentes músculos adutores da mandíbula, e até porções musculares, estariam ajustadas para esse comprimento a diferentes níveis de excursão e consequentemente de abertura da boca. A força estimada de um músculo individual seria específica para uma abertura de boca e não aconteceria de todos estarem no comprimento ideal ao mesmo tempo, embora entender esse comprimento e como é alterado relativo à abertura de boca seja interessante (Hartstone-Rose *et al.*, 2018). O mesmo poderia ser pensado para músculos dos membros que se conectam nos mesmos segmentos ósseos e que não se encurtam ou se estendem ao todo.

ESTIMATIVA DA PCSA

A PCSA é uma função do volume e comprimento das fibras musculares (Leonard *et al.*, 2021, 2022b). Abordamos previamente alguns dos métodos utilizados para obter o comprimento médio da fibra. A massa é facilmente medida por uma balança de precisão; músculos de pequenos mamíferos podem exigir uma alta precisão (< 10 mg). A massa pode representar o estado seco ou hidratado dos músculos. Usar a massa seca garante que a medida não seja afetada pelo estado de hidratação e fornece um método de comparação mais confiável (Turnbull, 1970). Para isso, os músculos são mantidos a uma temperatura constante até que a umidade seja perdida (*e.g.*, Morales *et al.*, 2018; Warburton *et al.*, 2013). No entanto, o uso da massa seca não é comum na literatura e obviamente corresponde a uma massa menor. Isso limitaria as comparações com trabalhos prévios que fornecem valores de PCSA com a massa úmida (Martin *et al.*, 2020), embora talvez não impossibilite em relação



à contribuição de músculos individuais, se assumirmos uma mudança proporcionalmente consistente entre músculos de um mesmo espécime (Anapol & Barry, 1996). A massa do músculo hidratado também representa melhor a realidade natural dos músculos (Anapol & Barry, 1996) e a PCSA, quando aplicada em modelos de produção de força, podem resultar em valores bem próximos a medições *in vivo* (Brassard *et al.*, 2020).

O volume muscular é estimado a partir da massa e uma densidade muscular para todos os músculos. As densidades geralmente usadas são de $1,0597 \text{ g.cm}^{-3}$ (algumas vezes arredondado para $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$) de Mendez & Keys (1960), determinado de músculos esqueléticos de cães e coelhos, ou de $1,0564 \text{ g.cm}^{-3}$ de Murphy & Beardsley (1974) com gatos. O uso de uma densidade constante vem sendo discutido e notado como problemático por alguns pesquisadores. Ward & Lieber (2005) mediram a densidade em função do método de fixação de músculos esqueléticos humanos de cadáveres fixados por imersão (formol 4%) e perfusão (formol 37%). A densidade média calculada para amostras fixadas por perfusão mostrou um valor próximo das estimativas anteriores ($1,055 \text{ g.cm}^{-3}$) mas foi diferente das amostras fixadas por imersão, de $1,112 \text{ g.cm}^{-3}$. Mais recentemente, Leonard *et al.* (2021) também avaliaram o uso generalizado dessas densidades constantes. A aplicação supõe que a densidade muscular é consistente entre músculos de diferentes regiões anatômicas (para a musculatura mastigatória ou dos membros) e ao longo do crescimento (através de diferentes estágios ontogenéticos), mas foram tiradas por Mendez & Keys (1960) e Murphy & Beardsley (1974), dos membros de espécimes adultos. Leonard *et al.* (2021) investigaram essas suposições em coelhos, e embora tenham achado uma tendência geral de músculos mais densos em indivíduos mais velhos, e diferenças entre as regiões anatômicas, uma medida de densidade constante parece razoável se não for possível medi-la diretamente. Constantes de $1,0558$ e $1,0502 \text{ g.cm}^{-3}$ foram fornecidas para músculos de adultos e juvenis, respectivamente, mas uma variedade de valores estão presentes no estudo (ver Tabela 6 em Leonard *et al.*, 2021), que deve melhorar a precisão em análises mais específicas, além destes valores serem derivados de uma grande amostra de músculos de diferentes regiões anatômicas e indivíduos de idades diferentes. Leonard *et al.* (2021) verificaram a densidade através de um kit de medição que usa o princípio de Arquimedes (Mettler Toledo MS-DNY-54). Penrose *et al.* (2020) usaram uma alternativa para conferir se a densidade de $1,056 \text{ g.cm}^{-3}$ (Murphy & Beardsley, 1974) seria uma estimativa confiável para calcular a PCSA. O volume obtido da divisão da massa de músculos adutores de dois espécimes de raposas (*Vulpes*) pela densidade de $1,056 \text{ g.cm}^{-3}$ foi comparado com o medido diretamente por um microvolumetro usando um método adaptado Douglass & Wcislo (2010) e Vickerton *et al.* (2013) não encontraram diferenças significativas.

O cálculo da PCSA também pode incorporar o ângulo de penação. Músculos com fibras penadas tendem a gerar mais força muscular com um mesmo volume devido ao maior número de fibras de comprimentos mais curtos. Contudo, o desvio das fibras em relação ao eixo muscular resulta em alguma perda da força (Vinyard & Taylor, 2010) e a PCSA não representaria a força gerada ao longo da linha de ação muscular. Assim, costuma-se corrigir a PCSA com a inclinação das fibras. O componente da força que atua perpendicular à linha de ação muscular é eliminado para determinar o vetor na direção da linha de tração (Leischner *et al.*, 2018):

$$PCSA = \frac{m}{\rho \times cf} \times \cos \theta$$

onde o volume muscular foi contabilizado ao dividir a massa do músculo m (g) pela densidade ρ (g.cm^{-3}), cf é o comprimento médio da fibra muscular (cm) e $\cos$ é o cosseno do ângulo de penação θ entre a fibra e a linha de ação (por vezes correspondida com a disposição do tendão dentro do músculo). Podemos posicionar um transferidor sobre o músculo, fotografá-lo e usar programas de imagem (novamente, como ImageJ) (Figura 4C-D) para medir o ângulo de penação (Martin *et al.*, 2019, 2020), ou ainda registrá-lo indiretamente. Se computarmos a distância perpendicular da linha de ação (ou tendão) à extremidade do fascículo no ventre muscular (a) e usar o comprimento do fascículo (cf), podemos estimar o ângulo através do arco seno (Anapol & Barry, 1996):

$$\arcseno\left(\frac{a}{cf}\right) = \theta$$

a pode ser representada como uma medida de espessura muscular (Figura 4E) e tem sido abordada dessa maneira (Leischner *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018). Entretanto, precisamos ter cuidado para que não haja uma má interpretação. A relação trigonométrica com o comprimento de fibra deve ser válida. Usar a espessura muscular, mesmo que perpendicular à linha de ação, independente do arranjo interno pode conduzir a superestimativas. Idealmente, as medidas devem ser realizadas *in situ*, com o músculo preso ao osso, e realizadas em diferentes locais para considerar toda a variação (Martin *et al.*, 2020). Porém, é comum que o ângulo seja medido com os músculos dissecados, mesmo que o reposicionamento e reorientação do músculo, como um tecido mole, possa alterar a posição angular dos fascículos.

Quando consideramos o efeito do ângulo de penação, a PCSA é reduzida. É comum nos trabalhos apresentarem a PCSA como RPCSA, do inglês "*reduced physiological cross-sectional area*". No entanto, mesmo que haja a perda, ela é pequena e inferior ao ganho do maior número de fibras dependendo do ângulo de penação (quando pequeno; Sinclair & Alexander, 1987).



Geralmente, os ângulos de penação nem são considerados quando abaixo de 30°, devido ao seu pequeno efeito (cosseno do ângulo está mais próximo de representar o valor total; Martin *et al.*, 2020), além do maior risco de subjetividade (Figura 4C). O ângulo de penação dos músculos dos membros é tipicamente pequeno e com isso pode nem ser levado em consideração (Shahar & Milgram, 2001; Taverne *et al.*, 2018), embora o método tenha sido aplicado inicialmente (Anapol & Barry, 1996). Isso é diferente para músculos mastigatórios que apresentam arranjos mais complexos que até podem criar alguns obstáculos para incorporar a correção. Razões práticas são levantadas devido à alta variabilidade da orientação de fibras e a dificuldade de medir corretamente o ângulo de penação *in situ*. Não seria adequado fazer a medição *ex situ* já que o aparato mastigatório inclui músculos que não possuem contrações lineares simples e que estão envolvidos num sistema que altera a orientação da linha de ação e dos ângulos de penação dependendo do estágio de adução da mandíbula. Além disso, músculos mastigatórios apresentam uma orientação angular em mais de um plano (coronal e parassagital) e a resolução de apenas um deles não seria suficiente. Essas complicações foram apontadas por Hartstone-Rose *et al.* (2018) que recomendaram calcular a PCSA sem a correção para os músculos mastigatórios até que esses aspectos tridimensionais sejam contabilizados.

OUTROS FATORES DE CORREÇÃO

Alguns fatores devem ser levados em consideração quanto à confiabilidade das informações usadas no cálculo da PCSA. Condições ideais para o estudo comparativo envolvem espécimes sem problemas patológicos na musculatura ou estrutura óssea, preservados igualmente e na mesma posição para minimizar efeitos na arquitetura de fibra. Isso nem sempre é possível. Enquanto danos podem ser óbvios, é mais difícil obter ou guardar espécimes armazenados em posições anatômicas similares, preferencialmente em repouso (*e.g.*, mandíbulas próximas da oclusão com crânio, membros perpendiculares ao corpo) (Martin *et al.*, 2019), caso não sejam diretamente coletados para este fim. Com isso, amostras preservadas em coleções mastozoológicas muito provavelmente combinarão espécimes preservados de diferentes formas e posições, comumente congelados ou em fluidos, especialmente para os pequenos mamíferos. Como a preservação do tecido mole não é ainda muito comum nas coleções mastozoológicas, materiais também armazenados no formol ou etanol fornecem uma fonte de espécimes para a prática desta técnica (Leonard *et al.*, 2022a). Além disso, práticas de fixação são utilizadas para prevenir alterações na musculatura *post mortem* (Leonard *et al.*, 2022a). Martin *et al.* (2019) por exemplo, fixaram espécimes com danos substanciais de atropelamento em formol para manter as características

anatômicas, o que permitiu utilizá-los no estudo. Espécimes também podem ser fixados para facilitar a identificação das delimitações musculares (ver o tópico de dissecação). No entanto, algumas propriedades desses agentes podem produzir mudanças no tecido mole. A necessidade e ultimamente o fornecimento de fatores de correção que aproximam os valores dos espécimes fixados daqueles coletados com o espécime fresco foram investigados para a massa, volume, densidade e comprimento de fibra de músculos submetidos a diferentes preparações. Leonard *et al.* (2022a) investigaram o efeito do congelamento, descongelamento/congelamento (espécimes descongelados e congelados uma segunda vez), fixação no formol 10% e preservação no etanol 70% depois do formol em músculos específicos de coelhos. O congelamento não impactou significativamente as características musculares, mas os músculos ainda tiveram massas e volumes levemente menores e um ajustamento (multiplicação) com fatores de 1,03 (quando congelados uma vez) e 1,09-1,1 (quando congelados duas vezes) seria razoável. A leve fixação no formol por duas semanas teve um efeito significativo na massa (fator de correção: 1,32) e volume (fator de correção: 1,32). A preservação pós-fixação no etanol 70% reduziu significativamente a massa (fator de correção: 1,69), volume (fator de correção: 1,64) e a densidade muscular (fator de correção: 1,03), por conta do ressecamento. Foram observados espécimes com até seis meses no etanol com intervalos de um, três e seis meses depois da fixação no formol. Houve um declínio inicial acentuado nos valores musculares que permaneceram relativamente constantes. O mesmo aconteceu quando Leonard *et al.* (2022b) avaliaram os efeitos do armazenamento do roedor *Mus musculus* no etanol a longo prazo (16-130 anos). Neste estudo, são fornecidos os fatores de correção de 2,64, 2,49, e 1,054 respectivamente para a massa, volume e densidade muscular de músculos do membro posterior. Entretanto, Leonard *et al.* (2022b) não encontraram um encurtamento significativo do comprimento dos fascículos obtidos quando os músculos estão fixados no esqueleto. É diferente de Kikuchi & Kuraoka (2014) que sugerem um ajuste de 9-13% para compensar o encurtamento do comprimento de fibra, além da redução de 14% para a massa, após um período de fixação no formol. Os músculos em Kikuchi & Kuraoka (2014) foram do membro anterior do primata *Gorilla gorilla* e preservados separados dos ossos. A preservação dos músculos presos aos ossos ou com as extremidades livres, ou armazenados diretamente no etanol ou previamente no formol, parece influenciar a arquitetura muscular. Mesmo o número de ciclos de descongelamento-congelamento pode ser maior que o investigado por Leonard *et al.* (2022a); eventualmente os freezers são limpos, organizados, passam por instabilidades no provimento de energia, falham, quebram ou diminuem a eficiência quando cheios. Para que os fatores de correção sejam bem empregados, é necessário que o método a



qual os espécimes foram armazenados sejam anotados através de protocolos de preservação contendo quando congelados, fixados e armazenados, se previamente foram congelados, e se foram transferidos (e quando) de uma solução para outra, além da composição e concentração das soluções (Leonard *et al.*, 2022b).

PERSPECTIVAS

A dissecação é um dos modos que possibilita verificar a morfologia e a função muscular em vertebrados (Rayfield, 2019). Mudanças na orientação, arquitetura interna, tamanho absoluto ou relativo, grau de diferenciação e subdivisão interna de músculos associados permitem compreender uma possível evolução adaptativa e influências seletivas nos animais, esperadas na execução de um comportamento (Herring, 1993). Estudos descritivos da musculatura abordam essa adaptação funcional. Warburton *et al.* (2012) compararam os músculos do membro posterior de um canguru arborícola (*Dendrolagus lumholtzi*) com outros macropodíneos terrestres. A musculatura diferiu substancialmente entre eles e sugere uma relação funcional às demandas mecânicas da locomoção no ambiente arbóreo. Quando compararam músculos relacionados à articulação do tornozelo do *Leopardus wiedii* com *L. geoffroyi*, felinos de hábitos arborícola e terrestre, Morales *et al.* (2018) registraram diferenças anatômicas e uma musculatura mais forte para realizar a inversão ou estabilizar a articulação quando de cabeça para baixo ou pendurado pelos pés no tronco de árvores. Adaptações músculoesqueléticas dos membros anteriores para cavar também foram achadas em marsupiais peramelemorfos (*Isoodon obesulus* e *Macrotis lagotis*) por Warburton *et al.* (2013). As adaptações refletem a necessidade de os membros produzirem força. Determinados músculos foram grandes e tiveram áreas de inserção ampliadas. Um maior volume muscular aumenta a magnitude de força que um músculo pode produzir, necessária em comportamentos que atuam contra uma resistência mecânica como a do solo durante a escavação (Warburton *et al.*, 2013).

As observações anatômicas podem ser apontadas em padrões morfológicos convergentes com outros mamíferos de mesmos hábitos, como arborícolas ou semi-fossoriais de diferentes linhagens apontados por Warburton *et al.* (2012; 2013). No entanto, similaridades anatômicas não estão apenas relacionadas a hábitos similares (Morales *et al.*, 2018). Tarefas diferentes podem fornecer demandas mecânicas parecidas e conduzir a observações semelhantes (Warburton *et al.*, 2013), mas as semelhanças também podem refletir a história filogenética. Dessa forma, informações musculares têm sido associadas a filogenia. Souza Junior *et al.* (2018, 2021) geraram um dendrograma das porcentagens de massa de grupos funcionais de músculos do membro torácico numa análise comparativa com carnívoros, encontrando

uma alta associação com a filogenia da ordem. Já Diogo *et al.* (2016) usaram as sinapomorfias musculares compartilhadas por todos os mamíferos e demonstraram a utilidade de estudar músculos para caracterizar certos clados, além de apontar um animal modelo (o gambá, *Didelphis virginiana*) anatomicamente mais plesiomórfico para estudar características ancestrais. De outra forma, podemos incorporar diferentes caracteres na filogenia. Estados de caráter como presença/ausência, local e extensão das áreas de fixação, são coletados de descrições anatômicas e mapeados através das relações entre os táxons (Druzinsky *et al.*, 2011).

Para que as comparações miológicas entre os animais sejam adequadas para estudos de ajuste morfofuncional, devemos incluir táxons proximamente relacionados, que exibem hábitos reconhecidamente diferentes e tamanhos similares. A diferença não seria atribuída a história filogenética ou ao tamanho, devido as demandas do maior ou menor corpo (Morales *et al.*, 2018). Embora táxons próximos com hábitos distintos já estejam incluídos no interesse do estudo, o tamanho é uma das principais fontes de variação dentro de determinados grupos de mamíferos (Marroig *et al.*, 2009; Shirai & Marroig, 2010). É difícil eliminar seu efeito numa abordagem descritiva, mas dados quantitativos são ajustáveis. Podemos converter os valores de massa e PCSA dos músculos individuais ou grupos funcionais como uma porcentagem da massa total (Oishi *et al.*, 2008; Warburton, 2009; Warburton *et al.*, 2013). Medidas corpóreas podem dividir os valores para fornecer uma estimativa relativa ao tamanho (Parmenter *et al.*, 2020; Perry & Wall, 2008; Taylor *et al.*, 2018) ou serem relacionadas ao tamanho (por regressão) quando com um número amostral maior. O tamanho pode ser representado pela massa corpórea ou pelo comprimento de um segmento ósseo. Em estudos com os músculos mastigatórios, são usadas medidas da mandíbula ou crânio, ou uma média de medições. Os resíduos de regressões lineares representam a variação não explicada pelo tamanho e são incorporados em análises comparativas (Hartstone-Rose *et al.*, 2018). Também podemos usar as regressões para verificar como a variável muscular escala com um estimador de tamanho corpóreo. Deve-se ter em mente que medidas de área, como a PCSA, e volumétrica, como a massa, aumentam em ritmos diferentes que medidas lineares (Anapol *et al.*, 2008). Quando usadas, dados de PCSA e massa são linearizados (tirados a raiz quadrada e cúbica) e convertidos em seus logaritmos para que escalem com similaridade geométrica e a inclinação isométrica seja 1 (Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2018; 2019; 2022). As variáveis são isométricas com a massa corpórea (m) quando a massa muscular escala com m^1 , PCSA com $m^{0,67}$ e comprimento do fascículo com $m^{0,33}$ ou com inclinações para a isometria igual 1, 0,67 ou 0,33, respectivamente (Mandarim-de-Lacerda, 2019; Martin *et al.*, 2020). Os limites inferior e superior do intervalo de confiança (geralmente 95%; $\alpha = 0,05$) entre as variáveis musculares



e os indicadores de tamanho indicam se foram diferentes da isometria (Martin *et al.*, 2019). Massa, comprimento médio do fascículo muscular e PCSA quando escalonados em grupos de mamíferos parecem mostrar uma tendência. A massa escala com isometria ou alometria positiva enquanto o comprimento médio do fascículo escala com isometria ou alometria negativa. A tendência de indivíduos maiores terem uma massa muscular relativamente maior e o comprimento do fascículo relativamente menor resulta na alometria positiva da PCSA para a maioria dos táxons e musculatura de diferentes regiões (Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2018; 2019, 2022; Leischner *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2019; Perry & Wall, 2008).

Em adição às informações musculares, a morfologia funcional combina outros elementos de análise (Herring, 1993; Schwenk, 2000). Por exemplo, análises biomecânicas podem ser aliadas ao estudo das mudanças na arquitetura muscular (Rayfield, 2019; Ward & Lieber, 2005). Embora a PCSA seja uma medida proporcional à produção de força, ela sozinha não determina o quanto dessa força é empregada pelo sistema. A eficiência com que a força muscular é transmitida a um determinado ponto é indicada pela vantagem mecânica – uma medida de análise de sistemas de alavanca (Greaves, 2012; Hartstone-Rose *et al.*, 2019).

Sistemas musculoesqueléticos podem ser representados como sistemas de alavanca: uma barra rígida (osso) a qual se aplica a força muscular que a rotaciona sobre um eixo (articulação), e uma força que resiste ao movimento, em reação à força muscular, como o peso do segmento, resistência da comida ou do solo. As diferentes organizações desses componentes resultam em classes de alavanca distintas: I, a articulação se posiciona entre as duas forças; II, resistência entre a articulação e a força muscular; III, força muscular entre a articulação e a resistência. Como a vantagem mecânica pode ser calculada como a relação entre o braço de alavanca muscular (distância perpendicular entre a articulação e a ação da força muscular) e o da resistência (distância perpendicular entre a articulação e a ação da força de resistência), os tipos de classe II e III enfatizam diferentes características do sistema de alavanca. Uma alavanca de classe II fornece uma vantagem mecânica mais alta para a força muscular enquanto a de classe III é mais desvantajosa mecanicamente para essa força, mas comumente achada nos sistemas ósseos. Isso significa que menos da força muscular está sendo transmitida numa alavanca de classe III e quanto mais distante for a força da articulação relativa a resistência, uma maior quantidade da força muscular poderia ser transmitida. A força seria aproveitada em diversos comportamentos como na mordida, escavação, propulsão ou escalada (Greaves, 2012; Warburton *et al.*, 2012; 2013).

Por outro lado, a ação muscular nos sistemas de alavanca com uma baixa vantagem mecânica possibilita movimentos mais rápidos do segmento. O quanto a

vantagem mecânica estaria favorecendo a força ou a velocidade tem sido pensado responder as variações dos requisitos mecânicos entre os táxons e seu uso pode oferecer correlações funcionais para o estudo anatômico muscular (Becerra *et al.*, 2014; Missagia *et al.*, 2021). As medidas de comprimento dos braços de alavanca dos músculos usam os locais de origem e inserção para estimar a linha de ação muscular (conectando as fixações ou os centroides das áreas de fixação quando amplas) igual a orientação da força muscular (Becerra *et al.*, 2014; Deutsch *et al.*, 2020). Já definir a orientação da força de resistência é mais complexo e menos previsível (Brassard *et al.*, 2020; Cleuren *et al.*, 1995; Herrel *et al.*, 1998). Podemos considerar diferentes orientações em que a resistência está sendo aplicada, mas é comum que seja abordado de uma maneira mais simples que isso, usando apenas a distância ao ponto em que a força seria aplicada e não perpendicular a uma orientação definida (Deutsch *et al.*, 2020; Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2019; 2022). De maneira similar, isso também tem sido empregado para a força muscular em um modelo simplificado da vantagem mecânica. Os braços de alavanca são medidos nesse modelo como a distância entre articulação e os locais de inserção dos músculos, e entre a articulação e o ponto em que a resistência estaria posicionada. A localização relativamente mais distal das inserções musculares e redução dos segmentos ósseos resultariam em vantagens mecânicas aprimoradas, como tem sido interpretada em descrições anatômicas (Warburton *et al.*, 2012; 2013). Esse modelo simplificado tem sido aplicado de maneira consistente em especial no aparato mastigatório, quando mandíbula não está em oclusão para estimativa das linhas de ação muscular (Cox *et al.*, 2020; Missagia *et al.*, 2021; Penrose *et al.*, 2020; Swiderski & Zelditch, 2010). Entretanto, os resultados devem ser abordados com alguma cautela. Os comprimentos dos braços de alavanca não consideram a orientação da força muscular e podem não ser representativos para a distância perpendicular da articulação às linhas de ação muscular (Swiderski & Zelditch, 2010).

A magnitude da força que é transmitida pelo sistema pode ser estimada da força muscular e o modelo de alavanca em equilíbrio estático (Greaves, 2012). Podemos usar a PCSA para obter uma estimativa da força muscular, quando escalonada a um valor de estresse muscular, geralmente tirado da literatura (25-30 N.cm⁻², Herzog, 1994; 3 kg.cm⁻², Close, 1972; 37 N.cm⁻² Weijs & Hillen, 1985; ver: Deutsch *et al.*, 2020; Fabre *et al.*, 2017; Ginot *et al.*, 2018; Hartstone-Rose *et al.*, 2012; 2019; 2022; Herrel *et al.*, 2008; Penrose *et al.*, 2020). A tendência da força rotacionar a alavanca, denominada de momento, é calculada como um produto da força e sua distância perpendicular ao eixo (braço de momento, similar ao braço de alavanca mencionado anteriormente) (Greaves, 2012). O momento da resistência tende rotacionar a alavanca no sentido contrário ao momento da força muscular. Na condição de equilíbrio estático,



como eventualmente pode ocorrer durante o movimento (e.g., quando a mandíbula para ao alcançar a comida ou o crânio; Greaves, 2012), a soma dos momentos é igual a zero:

$$\vec{M}_{\text{Músculo}} + \vec{M}_{\text{Resistência}} = 0 \text{ ou } F_M \times d_M + F_R \times d_R = 0$$

onde F_M é a força muscular, F_R é a força da resistência, d_M é o braço do momento muscular e d_R é o braço do momento da resistência.

Combinando a força muscular e os braços de momento da força muscular e da resistência, podemos estimar a magnitude da resistência suportada pelo músculo atuando maximamente. O valor máximo é deduzido da soma dos momentos dos músculos que participam do comportamento ($\vec{M}_{\text{Resistência}} + \sum \vec{M}_{\text{Músculos}} = 0$). É fácil demonstrar isso quando aplicado no aparato mastigatório como tem sido usado para estimar força de mordida máxima – de igual em magnitude e oposta a resistência máxima que seria aplicada pela comida (Brassard *et al.*, 2020). O uso da morfologia e arquitetura muscular nesses modelos tem fornecido boas previsões de desempenho (Brassard *et al.*, 2020; 2021; Ginot *et al.*, 2018; Herrel *et al.*, 2008; Santana *et al.*, 2010). Indicadores morfométricos para as medições musculares também têm correspondido bem aos resultados *in vivo*. Particularmente, essas estimativas se destacam no estudo morfológico pois estão sujeitas a uma menor limitação metodológica e do poder estatístico, uma vez que as informações musculares podem possuir grandes componentes de variação anatômica que é difícil discriminar como adaptativas ou do indivíduo (Davis, 1964) se um grande número de espécimes não for dissecado. Por outro lado, informações morfométricas possibilitam que grandes amostras sejam acessadas com uma grande amplitude sistemática, embora essas previsões ósseas devam ser avaliadas através de medições empíricas (Sicuro *et al.*, 2021). Mesmo que a relação entre o desempenho e dimensões morfométricas já tenha sido investigada com mamíferos (Brassard *et al.*, 2021; Chazeau *et al.*, 2013; Ellis *et al.*, 2008; Sicuro *et al.*, 2021), medições diretas de comportamentos dificilmente poderiam ser alcançadas para determinados grupos de mamíferos. Nesses casos, em vez da força ser medida diretamente, podemos usar uma estimativa relativa para a força máxima potencial. Indicadores com aproximações volumétricas, que considera a espessura muscular (e.g., secções transversais do método de Thomason; Thomason, 1991) (Figura 1E), parecem fornecer correlações mais fortes com o tamanho e PCSA (Dickinson *et al.*, 2021). Além de serem bem explorados em estudos morfométricos do crânio para inferências da musculatura, quando aliados aos do sistema de alavanca da mandíbula, também têm sido validados empiricamente como indicadores para o desempenho (Sicuro *et al.*, 2021).

A relação anatômica e mecânica entre os músculos e os ossos também possibilita a inferência da anatomia

e função muscular em táxons extintos (Paleomiologia; Perry & Prufrock, 2018). Propriedades musculares, como da arquitetura de fibra, dificilmente seriam caracterizadas diretamente nos fósseis. Nesse caso, podemos usar os indicadores osteológicos preditivos de análogos existentes para estimar essas variáveis. Perry *et al.* (2015) testaram e usaram dimensões osteológicas relacionadas ao tecido mole de estrepisirinos existentes para estimar o tamanho e PCSAs dos músculos mastigatórios de primatas adapídeos. Adicionalmente, a alavancagem e força de mordida também foi estimada. Já Fahn-Lai *et al.* (2020) caracterizaram a morfologia e arquitetura de fibra de músculos do ombro de táxons existentes morfologicamente conservados (*Didelphis virginiana* e *Salvator merianae*) que servem como modelos para reconstruir a anatomia muscular em fósseis de sinapsídeos não-mamíferos como demonstrado ao inferir PCSAs no cinodonte não-mamífero *Massetognathus pascuali*. Esses registros demonstram como inferências de características musculares podem ampliar a nossa compreensão da participação muscular na reconstrução e evolução funcional.

Finalmente, é errado assumir que estudos da musculatura sejam considerados onerosos ou defasados quando a morfologia descritiva e funcional continuam sendo necessárias e indispensáveis para a compreensão da evolução de mamíferos (Ford *et al.*, 2023). Este manuscrito foi dedicado a apresentar as possibilidades de uso das informações musculares obtidas da dissecação, um método pouco custoso e acessível. Esperamos que os métodos dispostos aqui auxiliem no desenvolvimento de estudos futuros, em particular com mamíferos Brasileiros e Neotropicais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos (JAFHA e DA) a Fernando Perini e à Coleção de Mamíferos da UFMG pelo empréstimo de espécimes cuja dissecação ajudou a preparar este trabalho e ao PPGBA pelo apoio financeiro. JAFHA recebe bolsa de Mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e auxílio da American Society of Mammalogists (ASM). GNG teve financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o desenvolvimento deste trabalho. DA e o Laboratório de Mastozoologia são ou foram financiados por apoios da CAPES, CNPq, FACEPE, FAPESP e ASM na coleta de dados usados em estudos que levaram a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Abdala F, Flores DA, Giannini NP. 2001. Postweaning ontogeny of the skull of *Didelphis Albiventris*. *Journal of Mammalogy* 82: 190-200. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082%3C0190:POOTSO%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082%3C0190:POOTSO%3E2.0.CO;2).



- Aerts P, D'Août K, Herrel A, Van Damme R. 2002. Introduction. Pp. 1-4, In: Aerts P, D'Août K, Herrel A, Van Damme R (Eds.), Topics in functional and ecological vertebrate morphology. Shaker Publishing, Maastricht.
- Anapol F, Barry K. 1996. Fiber architecture of the extensors of the hindlimb in semiterrestrial and arboreal guenons. *American Journal of Physical Anthropology* 99: 429-447. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199603\)99:3<429::AID-AJPA5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199603)99:3<429::AID-AJPA5>3.0.CO;2-R).
- Anapol F, Shahnoor N, Ross CF. 2008. Scaling of reduced physiologic cross-sectional area in primate muscles of mastication. Pp. 201-216, In: Vinyard C, Ravosa MJ, Wall C (Eds.), Primate craniofacial function and biology. Springer, Boston. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76585-3_10.
- Auricchio P, Salomão MG. 2002. Técnicas de coleta e preparação de vertebrados. Instituto Pau Brasil de História Natural, São Paulo. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2882.2807>.
- Becerra F, Echeverría AI, Casinos A, Vassallo AI. 2014. Another one bites the dust: Bite force and ecology in three caviomorph rodents (Rodentia, Hystricognathi). *Journal of Experimental Zoology* 321: 220-232. <https://doi.org/10.1002/jez.1853>.
- Bels V, Herrel A. 2019. Feeding, a tool to understand vertebrate evolution introduction to "feeding in vertebrates". Pp. 1-18, In: Bels V, Whishaw I (Eds.), Feeding in vertebrates: Evolution, morphology, behavior, biomechanics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13739-7_1.
- Böhmer C, Theil J-C, Fabre A-C, Herrel A. 2020. Atlas of terrestrial mammal limbs. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/b22115>.
- Brassard C, Merlin M, Guintard C, Monchâtre-Leroy E, Barrat J, Bausmayer N, Bausmayer S, Bausmayer A *et al.* 2020. Bite force and its relationship to jaw shape in domestic dogs. *Journal of Experimental Biology* 223. <https://doi.org/10.1242/jeb.224352>.
- Brassard C, Merlin M, Monchâtre-Leroy E, Guintard C, Barrat J, Garès H, Larralle A, Triquet R *et al.* 2021. Masticatory system integration in a commensal canid: interrelationships between bones, muscles, and bite force in the red fox. *Journal of Experimental Biology* 224: jeb224394. <https://doi.org/10.1242/jeb.224394>.
- Chazeau C, Marchal J, Hackert R, Perret M, Herrel A. 2013. Proximate determinants of bite force capacity in the mouse lemur. *Journal of Zoology* 290: 42-48. <https://doi.org/10.1111/jzo.12011>.
- Cleuren J, Aerts P, De Vree F. 1995. Bite and joint force analysis in *Caiman crocodilus*. *Belgian Journal of Zoology* 125: 79-94.
- Close RI. 1972. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews* 52: 129-197. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.129>.
- Cox PG, Morris PJR, Hennekam JJ, Kitchener AC. 2020. Morphological and functional variation between isolated populations of British red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Journal of Zoology* 312: 271-283. <https://doi.org/10.1111/jzo.12829>.
- Crook TC, Cruickshank SE, McGowan CM, Stubbs N, Wakeling JM, Wilson AM, Payne RC. 2008. Comparative anatomy and muscle architecture of selected hind limb muscles in the Quarter Horse and Arab. *Journal of Anatomy* 212: 144-152. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00848.x>.
- Davis DD. 1955. Masticatory apparatus in the spectacled bear, *Tremarctos ornatus*. Chicago Natural History Museum, Fieldiana, Zoology, Chicago. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.2809>.
- Davis DD. 1964. The giant panda: a morphological study of evolutionary mechanisms. Chicago Natural History Museum, Fieldiana, Zoology Memoirs, Chicago. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5133>.
- Deutsch AR, Dickinson E, Leonard KC, Pastor F, Muchlinski MN, Hartstone-Rose A. 2020. Scaling of anatomically derived maximal bite force in primates. *Anatomical Record* 303: 2026-2035. <https://doi.org/10.1002/ar.24284>.
- Dickinson E, Basham C, Rana A, Hartstone-Rose A. 2019. Visualization and quantification of digitally dissected muscle fascicles in the masticatory muscles of *Callithrix jacchus* using nondestructive DiceCT. *Anatomical Record* 302: 1891-1900. <https://doi.org/10.1002/ar.24212>.
- Dickinson E, Davis JS, Deutsch AR, Patel D, Nijhawan A, Patel M, Blume A, Gannon JL *et al.* 2021. Evaluating bony predictors of bite force across the order Carnivora. *Journal of Morphology* 282: 1499-1513. <https://doi.org/10.1002/jmor.21400>.
- Dickinson E, Hartstone-Rose A. 2023. Behavioral correlates of fascicular organization: The confluence of muscle architectural anatomy and function. *Anatomical Record* 1-13. <https://doi.org/10.1002/ar.25187>.
- Dickinson E, Stark H, Kupczik K. 2018. Non-Destructive determination of muscle architectural variables through the use of DiceCT. *Anatomical Record* 301: 363-377. <https://doi.org/10.1002/ar.23716>.
- Diogo R. 2017. Evolution driven by organismal behavior. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47581-3>.
- Diogo R, Bello-Hellegouarch G, Kohlsdorf T, Esteve-Altava B, Molnar JL. 2016. Comparative myology and evolution of marsupials and other vertebrates, with notes on complexity, bauplan, and "scala naturae." *The Anatomical Record* 299: 1224-1255. <https://doi.org/10.1002/ar.23390>.
- Douglass JK, Wcislo WT. 2010. An inexpensive and portable microvolumeter for rapid evaluation of biological samples. *BioTechniques* 49: 566-572. <https://doi.org/10.2144/000113464>.
- Druzinsky RE, Doherty AH, De Vree FL. 2011. Mammalian masticatory muscles: Homology, nomenclature, and diversification. *Integrative and Comparative Biology* 51(2): 224-234. <https://doi.org/10.1093/icb/ict067>.
- Ellis JL, Thomason JJ, Kebreab E, France J. 2008. Calibration of estimated biting forces in domestic canids: Comparison of *post-mortem* and *in vivo* measurements. *Journal of Anatomy* 212: 769-780. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00911.x>.
- Fabre P-H, Herrel A, Fitriana Y, Meslin L, Hautier L. 2017. Masticatory muscle architecture in a water-rat from Australasia (*Murinae, Hydromys*) and its implication for the evolution of carnivory in rodents. *Journal of Anatomy* 231: 380-397. <https://doi.org/10.1111/joa.12639>.
- Fahn-Lai P, Biewener AA, Pierce SE. 2020. Broad similarities in shoulder muscle architecture and organization across two amniotes: Implications for reconstructing non-mammalian synapsids. *PeerJ* 8: e8556. <https://doi.org/10.7717/peerj.8556>.
- Fisher RE, Adrian B, Elrod C, Hicks M. 2008. The phylogeny of the red panda (*Ailurus fulgens*): Evidence from the hindlimb. *Journal of Anatomy* 213: 607-628. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00987.x>.
- Ford KL, Albert JS, Summers AP, Hedrick BP, Schachner ER, Jones AS, Evans K, Chakrabarty P. 2023. A new era of morphological investigations: Reviewing methods for comparative anatomical studies. *Integrative Organismal Biology* 5: obad008. <https://doi.org/10.1093/iob/obad008>.
- Garland Jr, Losos JB. 1994. Ecological morphology of locomotor performance in squamate reptiles. Pp. 240-302, In: Wainwright PC, Reilly SM (Eds.), Ecological morphology: Integrative organismal biology. University of Chicago Press, Chicago.
- Ginot S, Herrel A, Claude J, Hautier L. 2018. Skull size and biomechanics are good estimators of *in vivo* bite force in murid rodents. *Anatomical Record* 301: 256-266. <https://doi.org/10.1002/ar.23711>.
- Greaves WS. 2012. The mammalian jaw: a mechanical analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hartstone-Rose A, Deutsch AR, Leischner CL, Pastor F. 2018. Dietary correlates of primate masticatory muscle fiber architecture. *The Anatomical Record* 301: 311-324. <https://doi.org/10.1002/ar.23715>.
- Hartstone-Rose A, Dickinson E. 2022. Functional correlates of lemur masticatory muscle fiber architecture visualized in 3D using DiceCT. *The FASEB Journal* 36. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R5290>.
- Hartstone-Rose A, Dickinson E, Deutsch AR, Worden N, Hirschhorn GA. 2022. Masticatory muscle architectural correlates of dietary diversity in Canidae, Ursidae, and across the order Carnivora. *The Anatomical Record* 305: 477-497. <https://doi.org/10.1002/ar.24748>.
- Hartstone-Rose A, Hertzog I, Dickinson E. 2019. Bite force and masticatory muscle architecture adaptations in the dietarily



- diverse Musteloidea (Carnivora). The Anatomical Record 302: 2287-2299. <https://doi.org/10.1002/ar.24233>.
- Hartstone-Rose A, Perry JMG, Morrow CJ. 2012. Bite force estimation and the fiber architecture of felid masticatory muscles. The Anatomical Record 295: 1336-1351. <https://doi.org/10.1002/ar.22518>.
- Herrrel A, Aerts P, De Vree F. 1998. Static biting in lizards: Functional morphology of the temporal ligaments. Journal of Zoology 244: 135-143. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1998.tb00015.x>.
- Herrrel A, De Smet A, Aguirre LF, Aerts P. 2008. Morphological and mechanical determinants of bite force in bats: Do muscles matter? Journal of Experimental Biology 211: 86-91. <https://doi.org/10.1242/jeb.012211>.
- Herring SW. 1972. The role of canine morphology in the evolutionary divergence of pigs and peccaries. Journal of Mammalogy 53: 500-512. <https://doi.org/10.2307/1379040>.
- Herring SW. 1993. Functional morphology of mammalian mastication. American Zoologist 33: 289-299. <https://doi.org/10.1093/icb/33.3.289>.
- Herring SW, Herring SE. 1974. The superficial masseter and gape in mammals. The American Naturalist 108: 561-576. <https://doi.org/10.1086/282934>.
- Herzog W. 1994. Muscle. Pp. 154-187, In: Nigg BM, Herzog W (Eds.), Biomechanics of the Musculoskeletal System. John Wiley, Chichester.
- Huxley HE. 1972. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. Pp. 301-387, In: Bourne GH (Ed.), The structure and function of muscle. Academic Press, New York.
- De Iuliis G, Pulerà D. 2019. The dissection of vertebrates. Elsevier/Academic Press.
- Kikuchi Y, Kuraoka A. 2014. Differences in muscle dimensional parameters between non-formalin-fixed (freeze-thawed) and formalin-fixed specimen in gorilla (*Gorilla Gorilla*). Mammal Study 39: 65-72. <https://doi.org/10.3106/041.039.0101>.
- Kiltie RA. 1982. Bite force as a basis for niche differentiation between rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T. pecari*). Biotropica 14: 188-195. <https://doi.org/10.2307/2388025>.
- Kiltie RA. 1984. Size ratios among sympatric neotropical cats. Oecologia 61: 411-416. <https://doi.org/10.1007/BF00379644>.
- Langenbach GEJ, Weijis WA. 1990. Growth patterns of the rabbit masticatory muscles. Journal of Dental Research 69: 20-25. <https://doi.org/10.1177/00220345900690010201>.
- Leischner CL, Crouch M, Allen KL, Marchi D, Pastor F, Hartstone-Rose A. 2018. Scaling of primate forearm muscle architecture as it relates to locomotion and posture. Anatomical Record 301: 484-495. <https://doi.org/10.1002/ar.23747>.
- Leonard KC, Worden N, Boettcher ML, Dickinson E, Hartstone-Rose A. 2022a. Effects of freezing and short-term fixation on muscle mass, volume, and density. Anatomical Record 305: 199-208. <https://doi.org/10.1002/ar.24639>.
- Leonard KC, Worden N, Boettcher ML, Dickinson E, Hartstone-Rose A. 2022b. Effects of long-term ethanol storage on muscle architecture. Anatomical Record 305: 184-198. <https://doi.org/10.1002/ar.24638>.
- Leonard KC, Worden N, Boettcher ML, Dickinson E, Omstead KM, Burrows AM, Hartstone-Rose A. 2021. Anatomical and ontogenetic influences on muscle density. Scientific Reports 11: 2114. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81489-w>.
- Mandarin-de-Lacerda CA. 2019. Ontogenetic and phylogenetic allometry (bivariate and multivariate) for young morphologists. International Journal of Morphology 37: 466-472. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000200466>.
- Marchi D, Leischner CL, Pastor F, Hartstone-Rose A. 2018. Leg muscle architecture in primates and its correlation with locomotion patterns. Anatomical Record 301: 515-527. <https://doi.org/10.1002/ar.23745>.
- Marroig G, Shirai LT, Porto A, Oliveira FB, de Conto V. 2009. The evolution of modularity in the mammalian skull II: Evolutionary consequences. Evolutionary Biology 36: 136-148. <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9051-1>.
- Martin ML, Travouillon KJ, Fleming PA, Warburton NM. 2020. Review of the methods used for calculating physiological cross-sectional area (PCSA) for ecological questions. Journal of Morphology 281: 778-789. <https://doi.org/10.1002/jmor.21139>.
- Martin ML, Warburton NM, Travouillon KJ, Fleming PA. 2019. Mechanical similarity across ontogeny of digging muscles in an Australian marsupial (*Isodon fusciventer*). Journal of Morphology 280: 423-435. <https://doi.org/10.1002/jmor.20954>.
- Mendez J, Keys A. 1960. Density and composition of mammalian muscle. Metabolism 9: 184-188.
- Missaglia R V, Patterson BD, Krentzel D, Perini FA. 2021. Insectivory leads to functional convergence in a group of Neotropical rodents. Journal of Evolutionary Biology 34: 391-402. <https://doi.org/10.1111/jeb.13748>.
- Morales MM, Moyano SR, Ortiz AM, Ercoli MD, Aguado LI, Cardozo SA, Giannini NP. 2018. Comparative myology of the ankle of *Leopardus wiedii* and *L. geoffroyi* (Carnivora: Felidae): functional consistency with osteology, locomotor habits and hunting in captivity. Zoology 126: 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.12.004>.
- Murphy R, Beardsley A. 1974. Mechanical properties of the cat soleus muscle *in situ*. American Journal of Physiology-Legacy Content 227: 1008-1013. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1974.227.5.1008>.
- Oishi M, Ogihara N, Endo H, Asari M. 2008. Muscle architecture of the upper limb in the orangutan. Primates 49: 204-209. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0082-5>.
- Parmenter MD, Nelson JP, Weigel SE, Gray MM, Payseur BA, Vinyard CJ. 2020. Masticatory Apparatus Performance and Functional Morphology in the Extremely Large Mice from Gough Island. Anatomical Record 303: 167-179. <https://doi.org/10.1002/ar.24053>.
- Penrose F, Cox P, Kemp G, Jeffery N. 2020. Functional morphology of the jaw adductor muscles in the Canidae. The Anatomical Record 303: 2878-2903. <https://doi.org/10.1002/ar.24391>.
- Perry JMG, Prufrock KA. 2018. Muscle functional morphology in Paleobiology: The past, present, and future of "Paleomyology." Anatomical Record 301: 538-555. <https://doi.org/10.1002/ar.23772>.
- Perry JMG, St Clair EM, Hartstone-Rose A. 2015. Craniomandibular signals of diet in adapids. American Journal of Physical Anthropology 158: 646-662. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22811>.
- Perry JMG, Wall CE. 2008. Scaling of the chewing muscles in prosimians. Pp. 217-240, In: Vinyard CJ, Ravosa MJ, Wall CE (Eds.), Primate craniofacial function and biology. Springer, New York.
- Rasband, WS. 1997-2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acessado em: 08 de outubro de 2023.
- Ravosa MJ, Ning J, Costley DB, Daniel AN, Stock SR, Stack MS. 2010. Masticatory biomechanics and masseter fiber-type plasticity. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions 10: 46-55.
- Rayfield EJ. 2019. What does musculoskeletal mechanics tell us about evolution of form and function in vertebrates? Pp. 45-70, In: Bels V, Whishaw I (Eds.), Feeding in vertebrates: Evolution, morphology, behavior, biomechanics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13739-7_3.
- Rayne J, Crawford GNC. 1972. The relationship between fibre length, muscle excursion and jaw movements in the rat. Archives of Oral Biology 17: 859-872. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(72\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(72)90029-5).
- Santana SE. 2018. Comparative anatomy of bat jaw musculature via Diffusible Iodine-Based Contrast-Enhanced Computed Tomography. Anatomical Record 301: 267-278. <https://doi.org/10.1002/ar.23721>.
- Santana SE, Dumont ER, Davis JL. 2010. Mechanics of bite force production and its relationship to diet in bats. Functional Ecology 24: 776-784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01703.x>.
- Schwenk K. 2000. Tetrapod feeding in the context of vertebrate morphology. Pp. 3-20, In: Schwenk K (Ed.), Feeding. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012632590-4/50002-2>.
- Shahar R, Milgram J. 2001. Morphometric and anatomic study of the hind limb of a dog. American Journal of Veterinary Research 62: 928-933. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.928>.
- Shirai LT, Marroig G. 2010. Skull modularity in neotropical marsupials and monkeys: Size variation and evolutionary constraint and



- flexibility. *Journal of Experimental Zoology* 314 B: 663-683. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21367>.
- Sicuro FL, Oliveira LFB, Hendges CD, Fonseca C. 2021. Quantifying bite force in coexisting tayassuids and feral suids: a comparison between morphometric functional proxies and *in vivo* measurements. *PeerJ* 9: e11948. <https://doi.org/10.7717/peerj.11948>.
- Silva JM, Carne L, John Measey G, Herrel A, Tolley KA. 2016. The relationship between cranial morphology, bite performance, diet, and habitat in a radiation of dwarf chameleon (*Bradypodion*). *Biological Journal of the Linnean Society* 119: 52-67. <https://doi.org/10.1111/bj.12819>.
- Sinclair AG, Alexander RM. 1987. Estimates of forces exerted by the jaw muscles of some reptiles. *Journal of Zoology* 213: 107-115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb03681.x>.
- Smith KK, Redford KH. 1990. The anatomy and function of the feeding apparatus in two armadillos (*Dasypoda*): Anatomy is not destiny. *Journal of Zoology* 222: 27-47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04027.x>.
- Souza Junior P, Santos LMRP, Viotto-Souza W, Carvalho NC, Souza EC, Kasper CB, Abidu-Figueiredo M, Santos ALQ. 2018. Functional myology of the thoracic limb in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*): a descriptive and comparative analysis. *Journal of Anatomy* 233: 783-806. <https://doi.org/10.1111/joa.12892>.
- Souza Junior P, Souza Pahim AB, Viotto-Souza W, Pellenz J, Bernardes FCS, Abidu-Figueiredo M, Santos ALQ. 2021. Evolutionary history or function? Which preponderates in the expression of the muscle mass of the thoracic limb in wild carnivores? *Anatomical Record* 304: 1344-1356. <https://doi.org/10.1002/ar.24593>.
- Swiderski DL, Zelditch ML. 2010. Morphological diversity despite isometric scaling of lever arms. *Evolutionary Biology* 37: 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11692-010-9081-8>.
- Taverne M, Fabre A-C, Herbin M, Herrel A, Peigné S, Lacroix C, Lowie A, Pagès F *et al.* 2018. Convergence in the functional properties of forelimb muscles in carnivores: adaptations to an arboreal lifestyle? *Biological Journal of the Linnean Society* 125: 250-263. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly123>.
- Taylor AB, Terhune CE, Toler M, Holmes M, Ross CF, Vinyard CJ. 2018. Jaw-muscle fiber architecture and leverage in the hard-object feeding sooty mangabey are not structured to facilitate relatively large bite forces compared to other papionins. *The Anatomical Record* 301: 325-342. <https://doi.org/10.1002/ar.23718>.
- Taylor AB, Vinyard CJ. 2020. *In situ* fiber length estimates from sectioned muscle bellies are not systematically shorter compared with fiber length estimates obtained using chemical digestion. *The FASEB Journal* 34: 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.02175>.
- Thomason JJ. 1991. Cranial strength in relation to estimated biting forces in some mammals. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2326-2333. <https://doi.org/10.1139/z91-327>.
- Turnbull WD. 1970. Mammalian masticatory apparatus. *Fieldiana: Geology*.
- Vickerton P, Jarvis J, Jeffery N. 2013. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. *Journal of Anatomy* 223: 185-193. <https://doi.org/10.1111/joa.12068>.
- Vinyard CJ, Taylor AB. 2010. A preliminary analysis of the relationship between jaw-muscle architecture and jaw-muscle electromyography during chewing across primates. *Anatomical Record* 293: 572-582. <https://doi.org/10.1002/ar.21121>.
- Warburton NM. 2009. Comparative jaw muscle anatomy in kangaroos, wallabies, and rat-kangaroos (Marsupialia: Macropodoidea). *Anatomical Record* 292: 875-884. <https://doi.org/10.1002/ar.20905>.
- Warburton NM, Grégoire L, Jacques S, Flandrin C. 2013. Adaptations for digging in the forelimb muscle anatomy of the southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) and bilby (*Macrotis lagotis*). *Australian Journal of Zoology* 61: 402-419. <https://doi.org/10.1071/ZO13086>.
- Warburton NM, Yakovlev M, Malric A. 2012. Anatomical adaptations of the hind limb musculature of tree-kangaroos for arboreal locomotion (Marsupialia: Macropodinae). *Australian Journal of Zoology* 60: 246-258. <https://doi.org/10.1071/ZO12059>.
- Ward SR, Lieber RL. 2005. Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. *Journal of Biomechanics* 38: 2317-2320. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.10.001>.
- Weijjs WA, Hillen B. 1985. Cross-sectional areas and estimated intrinsic strength of the human jaw muscles. *Acta Morphologica Neerlandica-Scandinavica* 23: 267-274.

Submetido em: 30/Junho/2023

Aceito em: 04/Outubro/2023