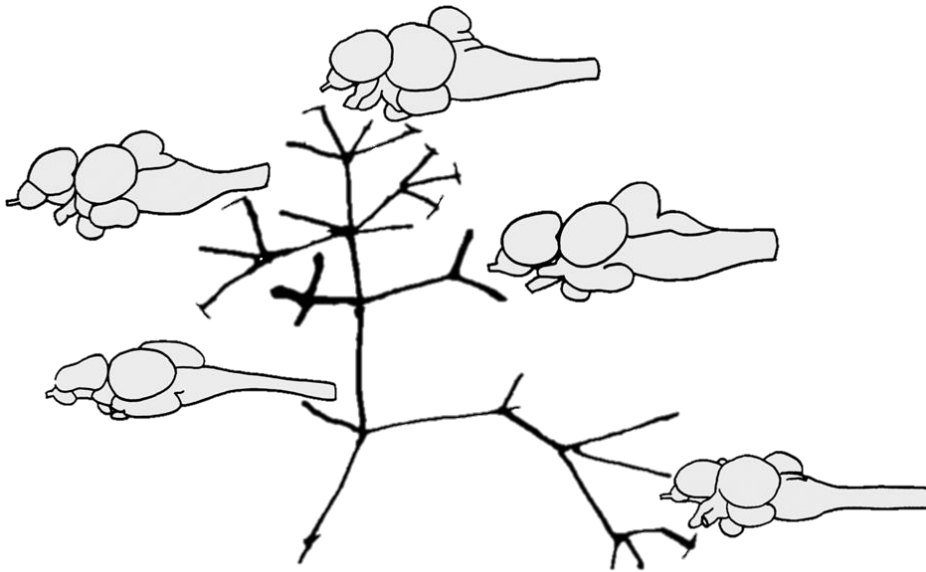


# Evolución del encéfalo en peces killis estacionales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)



Trabajo final de Investigación  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudiante: **Maximiliano Torres Pérez**

Orientadores: Sebastián Serra, Felipe Alonso

Tribunal: Melitta Meneghel, Bettina Tassino, Sebastián Serra

Montevideo, 13 de octubre de 2023

Autor: Maximiliano Torres Pérez

Lugar de realización de este trabajo: Sección Ictiología del Museo Nacional de Historia Natural, Ministerio de Educación y Cultura (MEC), Uruguay..

Lugar de trabajo del autor: Investigador en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Uruguay; Docente del Departamento de Ciencias Biológicas-Consejo de Formación en Educación-ANEP, Uruguay.

Contacto: torresperezmaxi@ gmail.com mtorres@ iibce.edu.uy

## NOTA DE ACLARACIÓN

La taxonomía de este trabajo está desactualizada a nivel de géneros, debido a que, durante el proceso de corrección, se publicó un trabajo nuevo de los orientadores de esta tesina (Alonso *et al.*, 2023) que modifica la taxonomía del grupo.

No obstante, la hipótesis filogenética se basa en ese trabajo.

Las consideraciones taxonómicas son las siguientes:

<b>Nombre en la tesina</b>	<b>Nombre válido actual</b>
<i>Austrolebias cheradophilus</i>	<i>Titanolebias cheradophilus</i>
<i>Austrolebias prognathus</i>	<i>Titanolebias prognathus</i>
<i>Austrolebias charrua</i>	<i>Garcialebias charrua</i>
<i>Austrolebias reicherti</i>	<i>Garcialebias reicherti</i>
<i>Austrolebias viarius</i>	<i>Garcialebias viarius</i>
<i>Austrolebias arachan</i>	<i>Garcialebias arachan</i>

*“El sistema nervioso representa el último término de la evolución de la materia viva y la máquina más complicada y de más nobles actividades que nos ofrece la naturaleza. En cuanto este sistema aparece, la unidad del sér (sic) viviente se acentúa, sus recursos para procurarse el alimento y sus defensas de los ataques del mundo exterior se multiplican, adquiriendo también mayor precisión, eficacia y congruencia; y en los peldaños más altos de la animalidad, á guisa de perfeccionamiento de estos aparatos defensivos, surgen fenómenos tan admirables como la sensación, el pensamiento y la voluntad.”*

**Santiago Ramón y Cajal (1852-1934).**

[Este es el primer párrafo de la más grande y maravillosa obra de la neurobiología de todos los tiempos: Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados (1886-1902)]

## **Dedicatoria**

Este trabajo, con el cual recibo mi título de biólogo, se lo dedico a mi madre quien, desde que yo era niño, se encargó que tuviera contacto con la naturaleza y lo que eso ha significado en mí.

# Evolución del encéfalo en peces killis estacionales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

## Resumen

---

Uno de los grandes objetivos de la biología evolutiva es entender la relación entre el fenotipo y la evolución de las especies. En organismos con un alto grado de encefalización y comportamientos complejos es relevante establecer relaciones entre la morfología del encéfalo y el comportamiento, la ecología y los sistemas sensoriales en un marco filogenético y evolutivo. La anatomía de las diferentes regiones del encéfalo en actinopterigios exhibe un amplio repertorio de morfologías que pueden variar y relacionarse, entre otras cosas, a las facultades de percepción sensorial, procesamiento central y respuestas comportamentales. En esta tesis, se estudió de forma comparativa y en un marco filogenético, la morfología y morfometría del encéfalo de especies seleccionadas de dos subgéneros distantes de *Austrolebias* con el fin de establecer una descripción de base de las características de la anatomía gruesa del encéfalo y analizar las diferencias encontradas entre especies y entre sexos. A partir del análisis morfológico, morfométrico y filogenético podemos concluir que: existe relativa variabilidad morfológica interespecífica y dimorfismo sexual en algunas estructuras encefálicas; existen diversas estructuras cuyo tamaño relativo es diferente según la especie, pero no existen dimorfismos sexuales; la hipótesis filogenética obtenida a partir de datos morfológicos y morfométricos, genera las agrupaciones y relaciones previamente propuestas por otros autores. Por lo tanto, los datos aquí obtenidos han resultado valiosos para reconstruir la historia evolutiva de las especies de teleósteos, estando éstas aún muy emparentadas.

Palabras clave: neuroanatomía, encéfalo, cladística, filogenia, caracteres morfológicos, anatomía comparada.

# Evolution of the brain in seasonal killifish of the genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)

## Abstract

---

One of the great objectives of evolutionary biology is to understand the relationship between the phenotype and the evolution of the species. In organisms with a high degree of encephalization and complex behaviors, it is relevant to establish relationships among the morphology of the brain behavior, ecology and sensory systems in a phylogenetic and evolutionary framework. The anatomy of the different regions of the brain in actinopterygians exhibits a wide repertoire of morphologies that can vary and be related, among other things, to the faculties of sensory perception, central processing, and behavioral responses. In this thesis, the morphology and morphometry of the brain of selected species from two distant subgenera of *Austrolebias* were studied comparatively and in a phylogenetic framework in order to establish a basic description of the characteristics of the gross anatomy of the brain and to analyze the differences found between species and between sexes. From the morphological, morphometric and phylogenetic analysis we can conclude that: there is relative interspecific morphological variability and sexual dimorphism in some brain structures; there are various structures whose relative size is different according to the species, but there are no sexual dimorphisms; the phylogenetic hypothesis obtained from morphological and morphometric data recovers the groupings and relationships previously proposed by other authors. Therefore, the data obtained here have been valuable for reconstructing the evolutionary history of teleost species, which are still closely related.

Key words: neuroanatomy, encephalon, cladistics, phylogeny, morphological characters comparative anatomy.





## AGRADECIMIENTOS

---

Le agradezco a mis tutores Sebastián y Felipe por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos y enseñarme y brindarme insumos que han sido de especial relevancia para mi formación. La solidez conceptual y la capacidad de trabajo de ambos han sido de gran provecho y, a través de esta tríada, se gestaron y gestarán trabajos y conocimientos bien fundamentados desde la anatomía, sistemática, taxonomía, ecología y evolución. Gracias por enseñarme, gracias por apostar y gracias por brindarme los espacios.

Le agradezco a Giovanni Furtado por su colaboración en los muestreos de campo. Gran compañero al pie del cañón para enseñarnos sus “charcos maravilla” inexistentes y enriquecer las noches de fogata con discusiones políticas.

Agradezco además a Melitta Meneghel y Bettina Tassino que, además de haberme formado en las materias del grado, tuvieron la amabilidad de corregir este trabajo. ¡MUCHAS GRACIAS!

Agradezco a mi familia y amigos por el apoyo constante, especialmente a mi madre, mi hermano Federico, Milton y Sabina.

Un agradecimiento especial para Alejandro Márquez (1970-2020), quien con gran entusiasmo y simpatía me abrió las puertas de su laboratorio en lo que fue un comienzo de tesina, siendo opacado por las vicisitudes de la vida.

Agradezco a la Facultad de Ciencias- UdelaR, por los inmensurables aportes que me ha dado durante tantos años.

Finalmente agradezco al Museo Nacional de Historia Natural por abrirme las puertas y permitir el desarrollo de este trabajo y otros que han surgido en paralelo.

# ÍNDICE

---

Resumen .....	5
Abstract.....	6
AGRADECIMIENTOS .....	8
ÍNDICE .....	9
1. Introducción .....	12
1.1. Objetivos .....	17
1.2. Hipótesis .....	17
2. Materiales y Métodos.....	19
2.1. Muestreo de taxa.....	19
2.2. Aspectos éticos y fijación de los ejemplares .....	20
2.3. Muestreos .....	20
2.4. Disecciones .....	21
2.5. Obtención de imágenes .....	21
2.6. Datos morfométricos .....	22
Mediciones corporales.....	22
Mediciones encefálicas para volúmenes .....	23
Mediciones de las estructuras de interés .....	24
2.7. Anatomía.....	26
2.8. Adaptaciones .....	26
2.9. Filogenia y evolución.....	27
3. Resultados .....	28
3.1. Anatomía.....	28
Morfología encefálica .....	28
Descripción de la morfología encefálica por especie .....	30
<i>Jenynsia lineata</i> .....	30
<i>Cynopoecilus melanotaenia</i> .....	31
<i>Austrolebias prognathus</i> .....	33
<i>Austrolebias cheradophilus</i> .....	35

<i>Austrolebias charrua</i> .....	36
<i>Austrolebias reicherti</i> .....	37
<i>Austrolebias viarius</i> .....	39
<i>Austrolebias arachan</i> .....	40
3.2. Anatomía comparada .....	42
Volúmenes encefálicos: comparación entre especies.....	42
Volumen encefálico respecto al volumen corporal .....	43
Correlaciones de volúmenes encefálicos respecto al cuerpo .....	43
Correlaciones de volúmenes de estructuras encefálicas respecto al volumen encefálico total (VET) .....	44
Volúmenes encefálicos: comparación entre sexos.....	45
Volúmenes de las estructuras encefálicas: comparación entre sexos .....	47
Volúmenes de las estructuras encefálicas: comparación entre especies .....	47
Análisis de morfometría lineal .....	50
Índices de variación de las estructuras .....	55
3.3. Filogenia.....	57
Definición de caracteres .....	57
Matriz de caracteres discretos cualitativos de la morfología encefálica .....	59
Matriz de caracteres de morfometría lineal del encéfalo .....	60
Filogenia .....	62
Sinapomorfías .....	63
Cambios evolutivos del encéfalo en las especies estudiadas.....	64
4. Discusión.....	66
Integración morfológica y morfométrica del encéfalo de las especies estudiadas .....	66
Relación entre los cambios evolutivos en la anatomía del encéfalo con la ecología y el comportamiento de las especies estudiadas.....	70
Filogenia obtenida a partir de datos morfológicos y morfométricos encefálicos.....	73
5. Conclusiones.....	75
Trabajos relacionados a la presente tesis.....	77
6. Referencias .....	78
	10



# 1. Introducción

---

*Biológicamente, tenemos una dependencia total, la independencia de la biosfera significa la muerte.*

*No sé muy bien si la vida es una materia envuelta en energía o si es energía envuelta en un caldo de materia.*

Lynn Margulis (1938-2011)

Con más de 35000 especies (Fricke *et al.*, 2023), los peces actinopterygios (Actinopterygii) representan la mayor radiación dentro de los vertebrados y han colonizado prácticamente todos los ambientes acuáticos en más de 400 millones de años de evolución (Mirande, 2017; Ghezelayagh *et al.*, 2022). Este grupo, exhibe una enorme diversidad en su morfología, en los hábitats que ocupan y en su Biología. Esta diversidad es, en parte, lo que dificulta la comprensión de su historia evolutiva y pueden presentar variaciones notables entre especies estrechamente relacionadas (Nelson, 2006).

Los peces del género *Austrolebias*, habitan generalmente en humedales temporarios, cuyo régimen hidrológico está principalmente regulado por el ciclo de precipitaciones y temperaturas, correlacionadas a la evapotranspiración de éstos. Se encuentra geográficamente distribuidos en la cuenca de Río de la Plata y cuencas aledañas, en particular en las costas Atlánticas al este de aquella y un par de especies fueron registradas en la cuenca amazónica, en zonas de recaptura de la cuenca alta del Plata del Río Paraguay, en Bolivia (Alonso *et al.*, 2016).

Los “peces anuales” o “estacionales”, también conocidos como los peces que “caen con la lluvia”, habitan ambientes acuáticos temporarios formados por la caída de precipitaciones y que se secan completamente durante una parte del año lo que implica la muerte de los adultos, aunque la viabilidad de la población reside en que estas especies depositan sus huevos en el sustrato donde pasan el periodo seco, que puede durar varios meses (2 a 8 dependiendo la región; Alonso *et al.*, 2019). Corresponden a un grupo de especies del Orden Cyprinodontiformes, vulgarmente conocidos como

“killis” (o “killifish” en inglés) (Alonso y Calviño, 2018), que habitan en África, familia Nothobranchiidae, y Sudamérica, familia Rivulidae. Dentro de esta última familia encontramos los peces estacionales del género *Austrolebias*. Este ciclo de vida único entre los vertebrados consiste en la deposición, por parte de los adultos, de huevos resistentes a la desecación en el sustrato de las charcas temporales que habitan. Poco antes de secarse esas charcas, los adultos mueren y cuando las condiciones ambientales vuelven a ser propicias los embriones, que han permanecido en los huevos latentes en el sustrato, dan lugar a una nueva generación (Berois *et al.*, 2012). El género *Austrolebias* comprende 52 especies, distribuidas en las cuencas costeras del Sur de Brasil y Uruguay, en la cuenca del Plata y con dos especies en el sur de la cuenca Amazónica, aledaña a la cuenca del Río Paraguay, en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Alonso *et al.*, 2016; Loureiro *et al.*, 2018; Volcan *et al.*, 2021; Lanés *et al.*, 2021). El género fue propuesto por Costa en el año 2006, quien realiza una filogenia en base a caracteres morfológicos y propone cinco grupos de especies, algunos de los cuales considerará luego como subgéneros (Costa, 2008). El género se caracteriza por la ausencia de escamas en el espacio entre el borde de la boca y la región anterior del preopérculo y la porción ventral del opercular, urohial profundo, y una banda vertical oscura que atraviesa el ojo, y presentan un rango de tamaños que van desde los 35 a 150 mm de longitud estándar (Costa, 2006).

Las diferencias ecológicas y comportamentales entre las especies podrían estar reflejadas en diferencias morfológicas a nivel del sistema nervioso, reportadas en el encéfalo de 3 especies de este género por Fernández *et al.* (2011). Un estudio neuroanatómico que abarque los diferentes grupos y subgéneros de especies podría resultar interesante para comprender procesos evolutivos determinados, relacionados a diferencias ecológicas y/ o comportamentales al mismo tiempo que resultar de relevancia taxonómica y filogenética. Esto es importante ya que, si bien el sistema nervioso central es muy variable entre especies, resultando una interesante fuente de caracteres, no ha sido muy utilizado como una fuente relevante para estudios filogenéticos, ascendiendo tan solo al 1% de los caracteres sinapomórficos para delimitar grupos (Datovo y Vari, 2014), aunque recientemente se han publicado algunos trabajos utilizando los mismos para inferencias filogenéticas o utilizando su potencial

uso o estudiando su evolución en contextos filogenéticos en peces (Rosa *et al.*, 2021; Abrahão *et al.*, 2018; Sukhum *et al.*, 2018). La variación del tamaño del cerebro es de interés debido a sus posibles vínculos funcionales con el rendimiento conductual y cognitivo. Además, se cree que la diversidad comportamental y cognitiva facilita la diversificación adaptativa al permitir que las poblaciones colonicen nuevos hábitats donde posteriormente experimentan una selección diversificadora de otros rasgos (Mayr, 1982).

El encéfalo de los actinopterigios, al igual que el del resto de los vertebrados, puede dividirse en 5 regiones, claramente diferenciadas en el desarrollo en sentido anteroposterior: 1) telencéfalo, representado por los bulbos olfatorios y los lóbulos telencefálicos; 2) diencéfalo, representado por el área preóptica, epitálamo, tálamo e hipotálamo con sus derivaciones como la hipófisis y el saco vasculoso; 3) mesencéfalo, representado por el *tectum* en posición dorsal y por múltiples estructuras multisensoriales y motoras en posición ventral como el *torus lateralis*; 4) metencéfalo, representado por el cerebelo en posición dorsal y varios núcleos y trayectos ventrales; y 5) mielencéfalo, representado por la médula oblonga que está conformada por haces, fascículos, formación reticular y varios núcleos motores y sensoriales como el núcleo vagal, facial y octavolateral (Meek & Nieuwenhuys, 1998).

La anatomía de las diferentes regiones del encéfalo en actinopterigios exhibe un amplio repertorio de morfologías encefálicas que pueden variar en menor o mayor grado dependiendo de diversos factores (Ishikawa *et al.*, 1999; Kotrschal *et al.*, 1998) y relacionados entre otras cosas a las facultades de percepción sensorial, procesamiento central y respuestas comportamentales. Se ha demostrado que diversas áreas encefálicas que son sustrato del procesamiento de algún tipo de modalidad sensorial pueden estar más o menos desarrolladas según la importancia funcional de dichos sistemas para una especie particular en un contexto ecológico dado (Leonard *et al.*, 1978; Birse *et al.*, 1980; Brandstätter y Kotrschal 1989, 1990). Esto genera diferencias en los tamaños relativos de diferentes regiones del encéfalo en diferentes especies o linajes evolutivos en relación a su ecosistema y comportamiento. Por ejemplo, los Ciprínidos béticos que se alimentan en zonas profundas de la columna de agua presentan una mayor capacidad de procesamiento de la información sensorial proveniente de las

señales químicas del medio que otras especies de esta familia que habitan en otros ambientes, teniendo poco desarrollado el *tectum*. En cambio, Ciprínidos que se alimentan en zonas más superficiales de la columna de agua presentan un sistema octavolateral más desarrollado, referido a la relevancia del sistema de línea lateral como modalidad sensorial. Las regiones encefálicas relacionadas con estas modalidades presentan un mayor desarrollo relacionado a una mayor capacidad de captación y procesamiento sensorial respecto a otras especies de la familia que habitan en otros ambientes (Brandstätter y Kotrschal 1989; Kotrschal y Palzenberger 1992). Si bien los encéfalos de estos dos grupos de Ciprínidos en el momento de la eclosión son altamente similares, estas estructuras atraviesan un patrón diferencial de desarrollo, que comienza desde la etapa larvaria y se extiende hacia toda la etapa juvenil (Brandstätter y Kotrschal 1989, 1990).

Los peces son ideales para los estudios de las causas y consecuencias de la variación encefálica. Dado que la morfología del cuerpo está vinculada a los ecotipos y la selección del hábitat, los caracteres morfológicos del encéfalo y el cuerpo y los factores ecológicos juntos podrían explicar mejor la diferenciación de las especies en sus nichos ecológicos y pueden conducir a una mejor comprensión de cómo los animales se adaptan a su entorno (Gebhardt & Hofmann 2023).

En organismos con un alto grado de encefalización y comportamientos complejos resulta muy relevante establecer relaciones entre la anatomía y morfología del encéfalo de diferentes especies con el comportamiento, la ecología y los sistemas sensoriales en un marco evolutivo como el que aporta la anatomía comparada en un marco filogenético (Herrick, 1902, 1906; Evans, 1931; Hennig, 1965; Kotrschal *et al.*, 1998).

Uno de los grandes objetivos de la biología evolutiva es entender la relación entre el fenotipo y la evolución de las especies (ej.: Tobias *et al.*, 2014). En particular, el comportamiento de los seres vivos resulta de importancia en la relación morfología-ambiente ya que aquél determina, en muchos casos, cómo la forma se relaciona con la función (Wcislo, 2021). Yendo un paso más allá, las estructuras que permiten el desarrollo de comportamientos resultan sumamente relevantes, entre las cuales destaca la anatomía del sistema nervioso y, particularmente en vertebrados, el encéfalo.



El mismo puede abarcarse desde estudios detallados de las redes de conexiones neuronales y endócrinas a enfoques más generalizados como los estudios de la anatomía gruesa del encéfalo que permiten aproximaciones metodológicas menos precisas, pero más rápidas a la hora de entender estas relaciones (Watanabe y Kono, 2022). En este sentido se ha estudiado la relación entre el desarrollo de diferentes áreas encefálicas con el grado de procesamiento de información sensorial o con la cantidad de información que procesan (ej.: Eifert *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2021). Esto se relaciona con la hipótesis del tejido costoso, en la que se postula que los tejidos nerviosos tienen un alto costo energético (producción y mantenimiento) por lo que existiría una presión selectiva negativa en contra del mayor incremento del tamaño de éstas evolutivamente. Por ende, este incremento sólo sería seleccionado positivamente en caso de que los beneficios de su mayor desarrollo, ligado a una mayor capacidad de procesamiento de información de un determinado tipo, tuviera una contraprestación netamente positiva que supere el costo del incremento del gasto energético asociado a su mayor tamaño (Niven y Laughlin, 2008; Navarrete *et al.*, 2011; Kotrschal *et al.*, 2013; Heldstab *et al.*, 2022). Asumiendo estas premisas es que en este contexto se plantea el estudio de la anatomía gruesa y grado de desarrollo de las principales regiones encefálicas dentro de un grupo de peces que habitan charcas estacionales con una particular biología y gran diversidad de ecofenotipos. Esto resultaría relevante a la hora de testear hipótesis de investigación y analizar si el tamaño de las áreas cerebrales se correlaciona con diferentes aptitudes ecológico-comportamentales de las especies. Recíprocamente, planteamos utilizar a las mismas como fuente de información para inferir la evolución de este grupo de especies, utilizándolas como fuentes de caracteres para realizar inferencias filogenéticas.

El encéfalo y los órganos sensoriales de los peces pueden variar considerablemente entre especies, muchas veces vinculado a patrones ecológicos y evolutivos, encontrándose divergencias entre especies cercanas evolutivamente y también convergencias entre especies distantes filogenéticamente, pero ecológicamente similares (Kotrschal *et al.*, 1998).

Dada la gran variabilidad y plasticidad neuroanatómica que poseen los peces actinoptergios y que ésta puede ser modificada en la ontogenia bajo presiones ambientales, me resulta interesante conocer la diversidad morfológica en el sistema nervioso central y estructuras asociadas de los diferentes grupos de especies del género *Austrolebias* y comparar estas estructuras con otros géneros del orden.

En este marco teórico se encuadra esta tesis, en la que estudié de forma comparativa y en un marco filogenético, la morfología del encéfalo de especies seleccionadas de dos subgéneros distantes de *Austrolebias* con el fin de establecer una descripción de base de las características de la anatomía gruesa del encéfalo y analizar las diferencias encontradas entre especies y entre sexos.

## 1.1. Objetivos

Por lo tanto, como objetivos generales de esta tesis se propone:

- 1) Caracterizar la morfología del encéfalo de especies seleccionadas del género *Austrolebias* considerando su dimorfismo sexual
- 2) Analizar posibles adaptaciones a nivel de la morfología gruesa en la evolución del encéfalo del género *Austrolebias*.
- 3) Evaluar el potencial de la información fenotípica del encéfalo como fuente de caracteres para la reconstrucción filogenética y obtención de sinapomorfías de los clados de *Austrolebias*.

## 1.2. Hipótesis

1. Las especies comparten patrones comunes a nivel de la anatomía gruesa, similares a otras especies de peces actinoptergios.
2. Las especies analizadas muestran características anatómicas únicas compartidas respecto del resto de peces actinoptergios estudiados.
3. Las especies analizadas muestran diferencias anatómicas entre sí.

4. Las especies estudiadas muestran diferentes grados de desarrollo en el volumen relativo del tamaño encefálico.
5. Las especies estudiadas muestran diferente tamaño relativo de las regiones encefálicas analizadas.
6. Las diferencias en los volúmenes relativos del encéfalo pueden relacionarse a diferentes características ecológicas y comportamentales.
7. Las diferencias y similitudes anatómicas a nivel de la anatomía gruesa del encéfalo entre las especies de *Austrolebias* contienen información relevante filogenéticamente.
8. Algunos caracteres de la anatomía encefálica presentan sinapomorfías para algunos clados de *Austrolebias*.
9. Los cambios evolutivos en la anatomía del encéfalo se relacionan con cambios ecológicos y comportamentales en la evolución del grupo.

Para ello, este trabajo se basó en 3 etapas de investigación:

1. Se analizó la morfología gruesa del encéfalo detalladamente y de forma comparativa entre las especies analizadas del género y respecto a otras especies de peces actinopterigios.
2. Se tomaron y compararon variables cuantitativas del encéfalo y de las diferentes regiones encefálicas, en las especies estudiadas.
3. Se generaron caracteres cualitativos discretos y caracteres cuantitativos continuos a partir de medidas lineales y se evaluó su utilidad como caracteres filogenéticos.

## 2. Materiales y Métodos

---

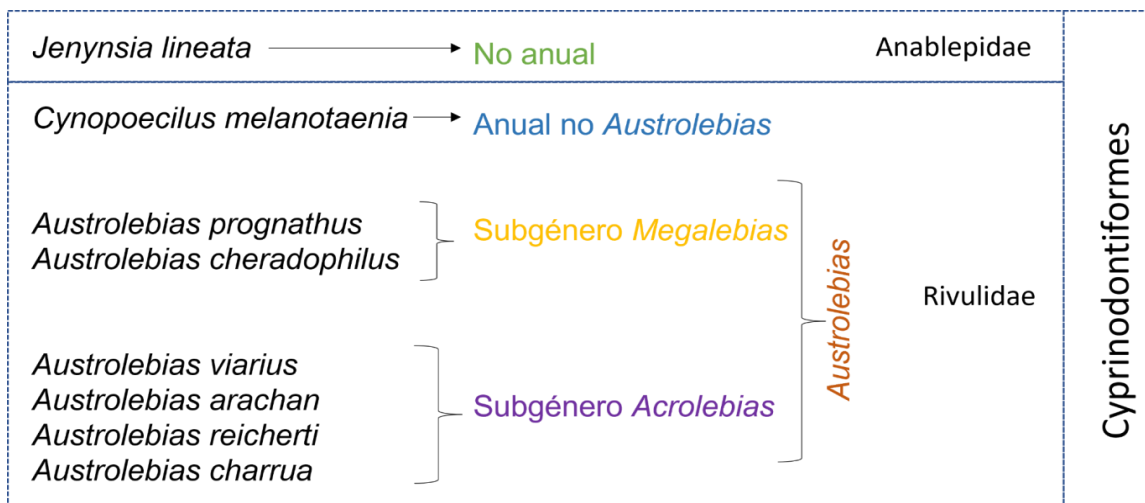
*En los animales superiores, las facultades mentales, aunque tan diferentes en su grado, son, sin embargo, de la misma naturaleza que las de la especie humana.*

Charles Darwin (1809-1882), *El origen del hombre*.

### 2.1. Muestreo de taxa

---

Para este estudio se utilizaron ejemplares de 6 especies del género *Austrolebias* pertenecientes a dos subgéneros (según Loureiro *et al.*, 2018): 1- *Megalebias*: *Austrolebias prognathus* y *Austrolebias cheradophilus*; y 2- *Acrolebias*: *Austrolebias viarius*, *Austrolebias arachan*, *Austrolebias reicherti* y *Austrolebias charrua* (Fig. 1). Estos dos subgéneros fueron utilizados para evaluar las variaciones y diferencias morfológicas y morfométricas en *Austrolebias* relativamente distantes en términos filogenéticos (Loureiro *et al.*, 2018). Con el objetivo de evaluar si existen variaciones significativas dentro de grupos más emparentados, se estudiaron dentro del subgénero *Acrolebias*, cuatro especies con diferente distancia filogenética (Loureiro *et al.*, 2018): Por un lado, *A. reicherti* y *A. charrua*, estrechamente emparentados, y *A. viarius* y *A. arachan*, un poco más distantes filogenéticamente de las anteriores (Fig. 1). Como grupos externos comparativos de las estructuras encefálicas, se tomaron una especie de la familia Rivulidae con ciclo de vida anual (*Cynopoecilus melanotaenia*) y una de la familia Anablepidae (*Jenynsia lineata*).



**Figura 1.** Esquema de las 8 especies analizadas en esta tesis, taxonomía y relaciones sistemáticas.

## 2.2. Aspectos éticos y fijación de los ejemplares

Los protocolos utilizados para la obtención, manejo y sacrificio de los animales fueron evaluados y aprobados por la CEUA del MNHN, con número: 03/2021

Los especímenes colectados fueron anestesiados hasta el plano profundo con Eugenol comercial y, por sobredosis se indujo la muerte. Inmediatamente después de constatar la muerte (cese de movimiento opercular y de reflejo *octavolateralis*), los individuos fueron fijados por inmersión con formol al 10%, en una relación de volumen animal y fijador de 1:20, durante 15 días. 1. Cabe destacar que el protocolo de fijación utilizado en este trabajo, fue puesto a punto a priori, en otros ensayos previos que realicé en el laboratorio de ictiología del MNHN.

## 2.3. Muestreos

Los individuos fueron colectados en charcos temporales de los departamentos de Rocha, Cerro Largo y Treinta y Tres, entre el 8 y el 10 de Julio de 2021, en las siguientes localidades:

*A. charrua*, y *C. melanotaenia*: Canal Andreoni y Ruta 14, 33°55'13.77"S 53°32'33.17"O.

*A. reicherti*: Sur de Melo, Río Tacuarí, 32°27'42.24"S 54°10'11.32"O.

*A. cheradophilus* y *A. viarius*: Arroyo Pirarajá, 33°42'54.46"S 54°43'12.45"O.

*A. prognathus*: Arroyo Retamosa, 33°41'28.55"S 54°41'16.69"O.

*A. arachan*: sur de Melo, Río Tacuarí, 32°27'42.24"S 54°10'11.32"O.

*J. lineata*: Canal en Ruta 19 antes de llegar a la Ruta 15, 33°31'38.98"S 53°54'19.26"O.

Durante el proceso de colecta se utilizaron redes de mano ("calderines"), colocando los especímenes en recipientes con agua del charco. En todo el proceso de colecta participaron 3 personas.

## 2.4. Disecciones

---

Se realizó la disección del encéfalo de cada animal, asistido con lupa estereoscópica y pinzas de disección finas, siguiendo los siguientes pasos: (1) se retiró la piel y músculos, (2) se retiraron las estructuras óseas dorsales y laterales del cráneo, (3) se seccionaron los nervios craneales, estructuras vasculares y meníngeas, (4) se retira el encéfalo y se coloca en un tubo Eppendorf con agua corriente. Las muestras permanecieron en este medio unas horas hasta ser fotografiadas.

## 2.5. Obtención de imágenes

---

Previo a la disección del encéfalo, los animales fueron fotografiados con cámara NIKON COOLPIX P90, con rótulo para cada individuo y una regla milimétrica de referencia.

Para la obtención de imágenes de los encéfalos, fueron sumergidos en azul de metileno acuoso durante 2 segundos y lavados por inmersión en agua para retirar el exceso de colorante. Este paso previo, se utiliza para generar mejores contrastes de las estructuras encefálicas, permitiendo una mejor resolución para el posterior análisis. Los encéfalos fueron colocados en placas de Petri y mantenidos en posición

anatómica, asistida por alfileres entomológicas apiladas formando un cuadrante (sin puncionar el tejido) y se obtuvieron micrografías digitales con lupa estereoscópica NIKON (modelo SMZ445) y cámara fotográfica AM Scope (modelo MU853B). Por cada encéfalo se obtuvieron 4 micrografías: 1-vista lateral, 2-vista dorsal, 3-vista ventral y 4-regla de microcalibración como referencia.

## 2.6. Datos morfométricos

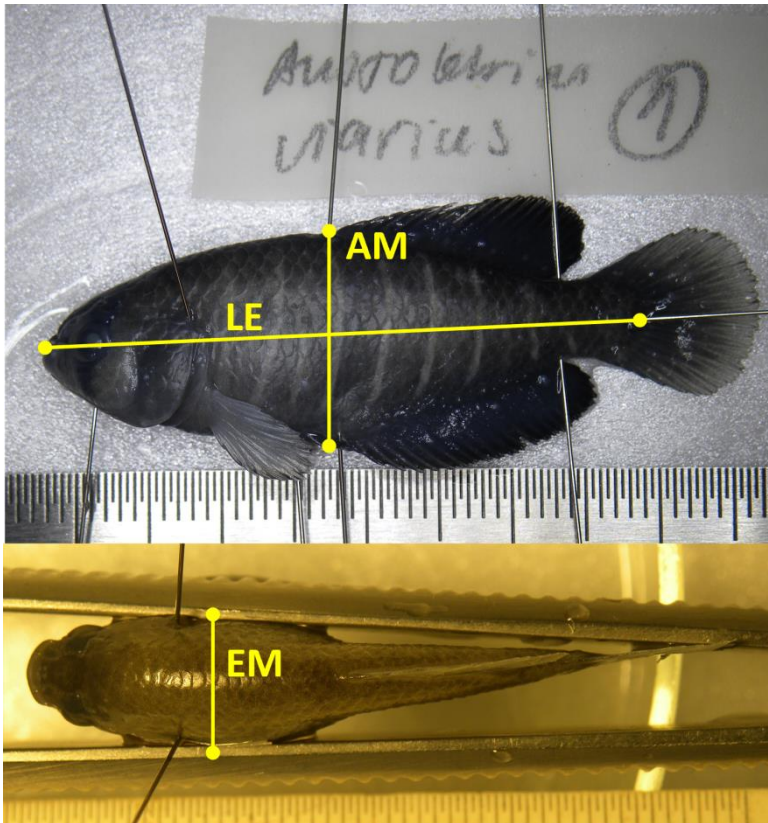
---

Para obtener los datos cuantitativos de las estructuras tanto macroscópicas corporales como microscópicas encefálicas, las imágenes digitales y sus respectivas reglas de calibración fueron cargadas al programa FIJI (ImageJ), calibradas y utilizando las herramientas de medición, se tomaron las siguientes medidas 1-corporales y 2-encefálicas para volúmenes y medidas lineales:

### *Mediciones corporales*

---

- Longitud estándar (LE en Fig. 2)
- Altura máxima del cuerpo (AM en Fig. 2)
- Ancho del cuerpo máximo (EM en Fig. 2)



**Figura 2.** Esquema de las mediciones corporales tomadas para cada ejemplar. Los alfileres entomológicos se colocaron en los cuerpos de los animales para tener puntos de referencia homólogos. LE: largo estándar. AM: altura máxima. EM: espesor máximo.

### *Mediciones encefálicas para volúmenes*

- Telencéfalo:
  - Largo máximo del telencéfalo dorsal: 1 en Fig. 3
  - Alto máximo del telencéfalo ventral: 2 en Fig. 3
  - Ancho máximo del telencéfalo ventral: 3 en Fig. 3
- Bulbo olfatorio:
  - Largo máximo del bulbo olfatorio: 4 en Fig. 3
  - Alto máximo del bulbo olfatorio: 5 en Fig. 3
  - Ancho máximo del bulbo olfatorio: 6 en Fig. 3
- Diencefalo:
  - Largo máximo del lóbulo inferior diencefálico: 7 en Fig. 3

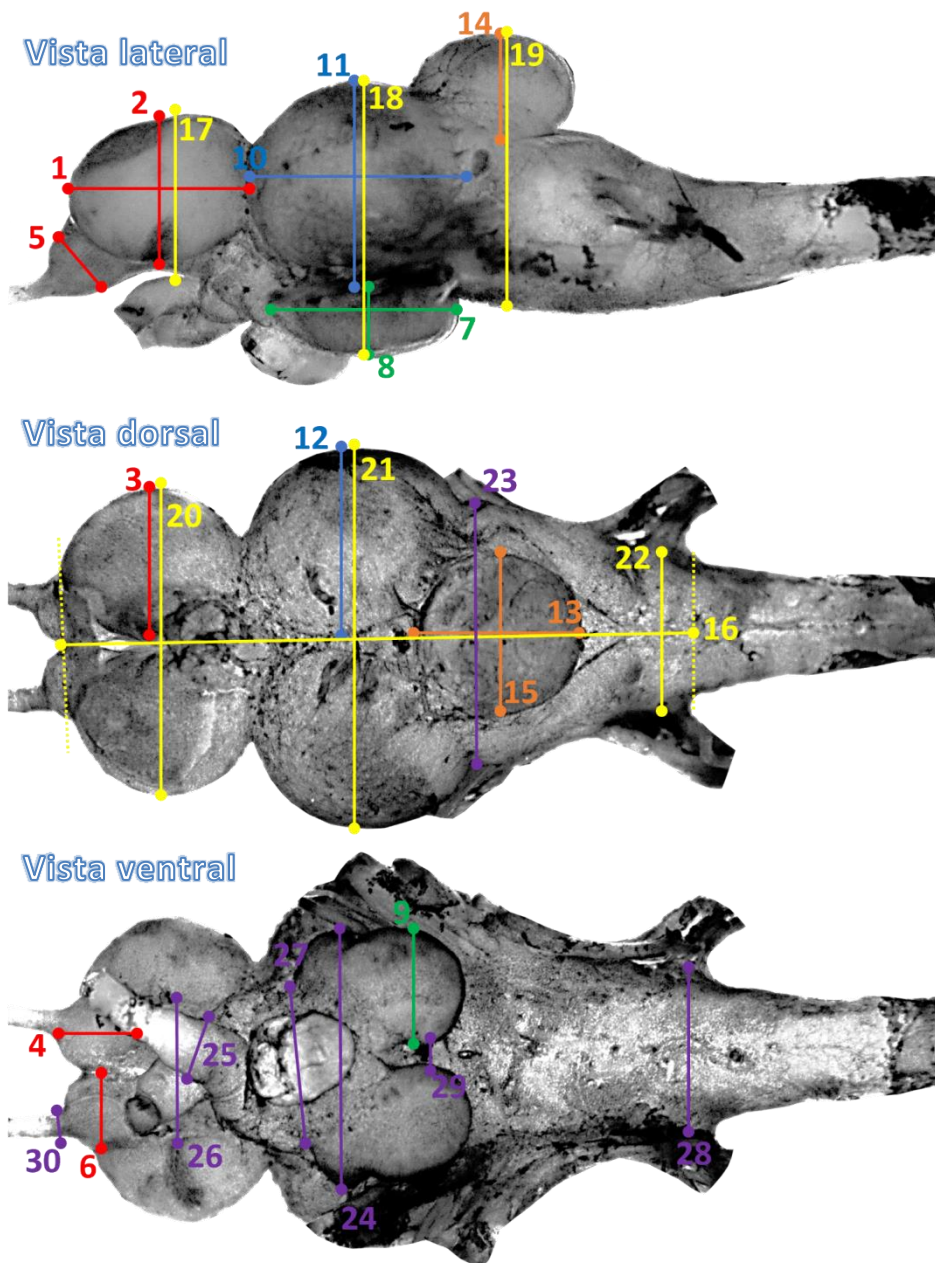


- Alto máximo del lóbulo inferior diencefálico: 8 en Fig. 3
- Ancho máximo del espacio interlobular inferior: 9 en Fig. 3
- Mesencéfalo:
  - Largo máximo del *tectum*: 10 en Fig. 3
  - Alto máximo del *tectum*: 11 en Fig. 3
  - Ancho máximo del *tectum*: 12 en Fig. 3
- Rombencéfalo:
  - Largo máximo del *corpus cerebelli*: 13 en Fig. 3
  - Alto máximo del *corpus cerebelli*: 14 en Fig. 3
  - Ancho máximo del *corpus cerebelli*: 15 en Fig. 3
- Encéfalo entero:
  - Largo estándar del encéfalo: 16 en Fig. 3
  - Alto rostral del encéfalo: 17 en Fig. 3
  - Alto medio del encéfalo: 18 en Fig. 3
  - Alto posterior del encéfalo: 19 en Fig. 3
  - Ancho rostral del encéfalo: 20 en Fig. 3
  - Ancho medio del encéfalo: 21 en Fig. 3
  - Ancho posterior del encéfalo: 22 en Fig. 3

### *Mediciones de las estructuras de interés*

---

- Ancho del cerebelo entero: 23 en Fig. 3
- Ancho del *torus lateralis*: 24 en Fig. 3
- Ancho del nervio óptico a nivel del quiasma: 25 en Fig. 3
- Ancho del telencéfalo ventral: 26 en Fig. 3
- Ancho del hipotálamo: 27 en Fig. 3
- Ancho de la médula oblonga: 28 en Fig. 3
- Espacio entre los lóbulos inferiores diencefálicos: 29 en Fig. 3
- Ancho del nervio olfativo: 30 en Fig. 3



**Figura 3.** Esquema de las diferentes mediciones encefálicas (30) tomadas para cada espécimen. En rojo, mediciones telencefálicas (1-6); en verde, mediciones diencefálicas (7-9); en celeste, mediciones mesencefálicas (10-12); en naranja, mediciones metencefálicas (13-15), en amarillo, mediciones del encéfalo completo (16-22); y en violeta, diferentes mediciones tomadas puntualmente de diferentes estructuras de interés (23-30).

## 2.7. Anatomía

---

Mediante observación bajo lupa y asistido de registro fotográfico, se realizaron dibujos de las siluetas del encéfalo y de sus estructuras observadas desde la superficie. Los dibujos se realizaron para cada sexo en vista lateral, dorsal y ventral y se realizó una descripción detallada de los aspectos morfológicos, de relación y de disección para cada especie. La descripción por especie se realizó en base al análisis grueso bajo microscopio estereoscópico, describiendo lo observado de forma más consensuada.

## 2.8. Adaptaciones

---

Con los valores provenientes de la medición del encéfalo y del cuerpo de los especímenes, se realizaron diversos test estadísticos (ANOVA, correlaciones lineales) en los programas Prisma Graph Pad 7.0 y en el programa Infostat. Se contrastaron los valores de estructuras encefálicas lineales y de volumen, así como también las encefálicas entre sexos y entre especies para conocer si existen diferencias significativas. Los volúmenes se calcularon aproximando el mismo al de un elipsoide. El volumen (V) de un elipsoide está dado por la ecuación  $V=(4/3)\pi abc$ , donde a, b y c son las longitudes de los semiejes del elipsoide respecto de los ejes x, y, z. Además se realizaron estudios de correlación y de porcentajes relativos en cada sexo y especie para conocer la variación entre sexos e interespecies. Adicionalmente, se analizó una aproximación a un índice de variación de los volúmenes y de las medidas lineales de las estructuras estudiadas, usando la siguiente fórmula: índice de variación (IV) de la estructura X= (cantidad de especies en que es diferente la estructura X con significancia estadística + 1) / total de especies analizadas. Usando el programa Prisma Graph Pad se utilizan los datos de volúmenes o lineales de una estructura. Para ejemplificarlo, tomemos el telencéfalo dorsal: Se realizó un test de ANOVA con análisis de la media y varianza posterior. Este procedimiento nos arrojó dos valores importantes: 1-la cantidad de combinaciones de especies posibles para comparar sus medias, y 2- cuántas de esas combinaciones resultan con diferencias significativas. De este modo, para los volúmenes del telencéfalo dorsal se registraron 28 combinaciones posibles, de las cuales sólo 2

combinaciones de especies resultan significativas para el telencéfalo dorsal, entonces tenemos:  $IV=(2+1)/28$ . El término "+1" se emplea para evitar errores matemáticos cuando la variación es 0 (en el caso de otras estructuras). Este análisis nos permite aproximar de forma somera a la variación morfométrica de las estructuras, para conocer potencialmente estructuras poco o muy variables, cuando se aproxima a 1, más variación relativa tiene esa estructura.

Con los volúmenes encefálicos y corporales se calculó el porcentaje encefálico respecto al volumen corporal.

## 2.9. Filogenia y evolución

---

En base a los caracteres morfológicos propuestos se realizó una matriz de caracteres codificando los mismos en las especies estudiadas. Además, se construyó una matriz con las medidas lineales del encéfalo a través de su estandarización a la longitud estándar (LE) y luego su estandarización a valores entre 0 y 1 siguiendo la metodología de Goloboff *et al.* (2006) para el análisis de caracteres continuos. Tomando de base las medidas de largos relativizadas a la LE del pez se calculó el mínimo como la media para esa especie menos su DE y la máxima es la media más el DE. Eso luego se relativizó para todas las especies para cada variable, con la siguiente fórmula: Valor relativizado=(valor original-valor mínimo de todas las especies)/(el valor máximo de esa variable de todas las especies-valor mínimo de esa variable para todas las especies). Los análisis filogenéticos se realizaron bajo máxima parsimonia utilizando pesos iguales con el software TNT y los algoritmos de nuevas tecnologías (Goloboff *et al.*, 2008). Producto de este análisis, además, se determina si existen sinapomorfías en las estructuras encefálicas analizadas. El apoyo de los clados se estimó mediante remuestreo simétrico (1000 repeticiones, con 10 secuencias de adición, ahorrando hasta 10 árboles cada una), expresado como **valores de GC, es decir, grupos presentes/contradichos** (Goloboff *et al.*, 2003).

## 3. Resultados

---

*El jardín de la neurología brinda al investigador espectáculos cautivadores y emociones artísticas incomparables.*

Santiago Ramon Cajal (1852-1934), *Recuerdos de mi vida*.

### 3.1. Anatomía

---

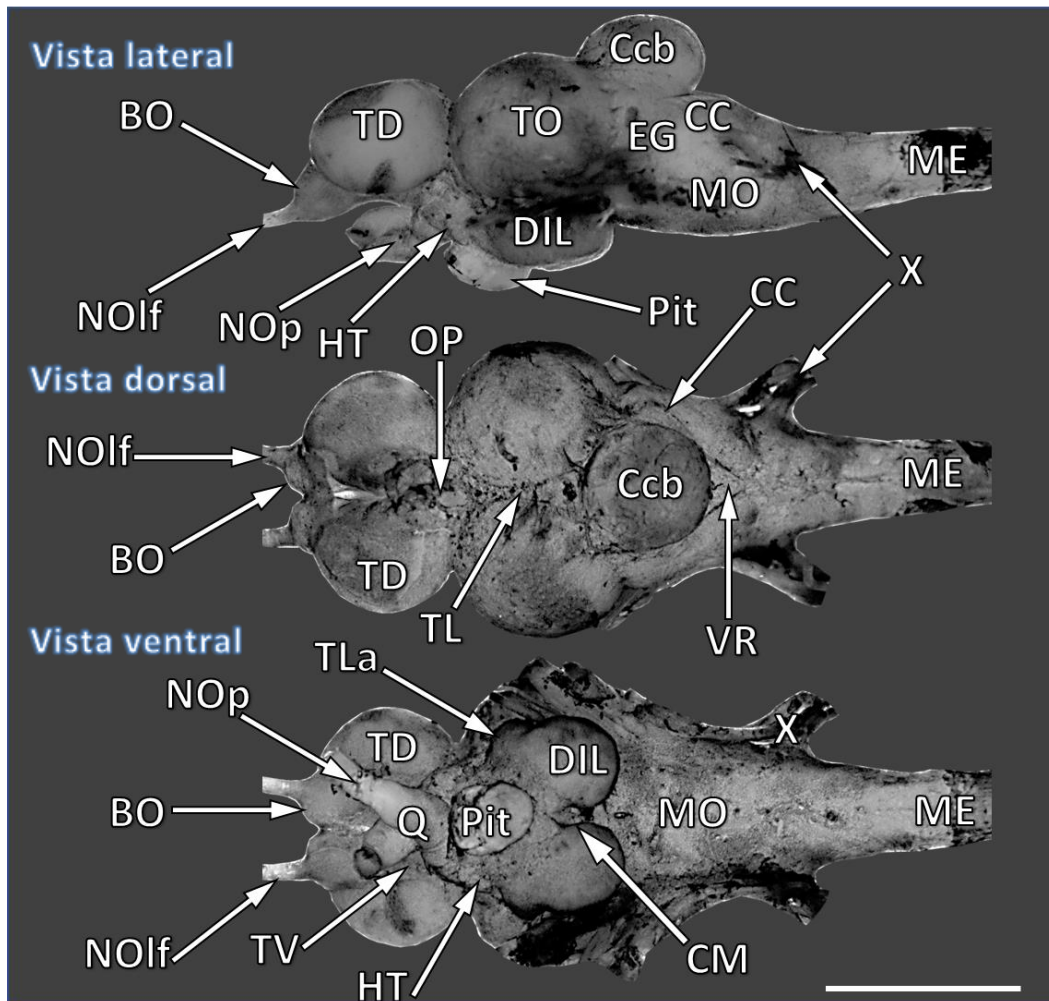
En esta sección se muestran los resultados de las descripciones de la anatomía gruesa encefálica externa de los especímenes estudiados. Primero, se describen las principales divisiones encefálicas del encéfalo de los teleósteos tomando como modelo *A. prognathus*. Luego se realiza una descripción anatómica del encéfalo de las especies estudiadas en este trabajo, tanto de las especies de interés (*Austrolebias* spp.) como los grupos externos (*C. melanotaenia* y *J. lineata*), con especial énfasis en aquellas estructuras que serán analizadas morfométricamente en la siguiente sección. El origen aparente de los pares craneales III-X y el nervio de la línea lateral no se describieron en este trabajo.

### Morfología encefálica

---

El encéfalo de las especies estudiadas presentó una morfología gruesa general similar a otras especies de peces teleósteos estudiados (Meek y Nieuwenhuys, 1998). En sentido anteroposterior se pueden distinguir: (1) el telencéfalo, compuesto por los lóbulos telencefálicos y el bulbo olfatorio; (2) el diencéfalo, presentando el epitálamo con el órgano pineal que emerge por encima de la habénula y el hipotálamo ventralmente, conectado estrechamente a la hipófisis, y con un lóbulo inferior con notable desarrollo, característico de los teleósteos; (3) el mesencéfalo, representado por el *tectum*, contactando ambos casquetes en vista dorsal e impidiendo la visualización del *torus longitudinalis*; y (4) el rombencéfalo, representado por (a) estructuras metencefálicas

como el *corpus cerebelli* en vista dorsal, el lóbulo caudal como una estructura prominente y la eminencia granular en los laterales, con un notable desarrollo, y (b) estructuras mielencefálicas como la médula oblonga, nervios craneales y el lóbulo vagal presentando una amplia apertura dorsal derivada del ventrículo rombencefálico. En la figura 4 se indican las estructuras encefálicas en *Austrolebias prognathus* cuya morfología macroscópica es descrita a continuación para cada especie.



**Figura 4.** Encéfalo de *Austrolebias prognathus*. Se observan las diferentes estructuras macroscópicas analizadas cualitativa y cuantitativamente. BO: bulbo olfatorio. CC: *crista cerebelli*. Ccb: *corpus cerebelli*. CM: cuerpos mamilares. DIL: lóbulo inferior diencefálico. EG: eminencia granular. HT: hipotálamo. ME: médula espinal. MO: médula oblonga. NOlf: nervio olfativo. NOp: nervio óptico. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. Q: quiasma óptico. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. VR: ventrículo rombencefálico. X: nervio vago. Barra = 0,5 mm.

## Descripción de la morfología encefálica por especie

---

La descripción por especie se realizó en base al análisis grueso bajo microscopio estereoscópico, describiendo lo observado de forma más consensuada, pero, cabe destacar que a veces se observan morfologías atípicas intragrupo. Por ejemplo, los bulbos olfatorios de *Austrolebias charrua* se presentan más o menos separados entre sí en la línea media formando un ventrículo medial, sin embargo, en un espécimen se constató que ambos bulbos olfatorios estaban adosados entre sí, careciendo de espacio ventricular. Otro ejemplo se presentó en *Austrolebias viarius*, en la que en un espécimen cuyo fenotipo externo era claramente de macho, algunas estructuras encefálicas poseían una morfología característica de hembras. En este caso, las gónadas concuerdan con el fenotipo externo.

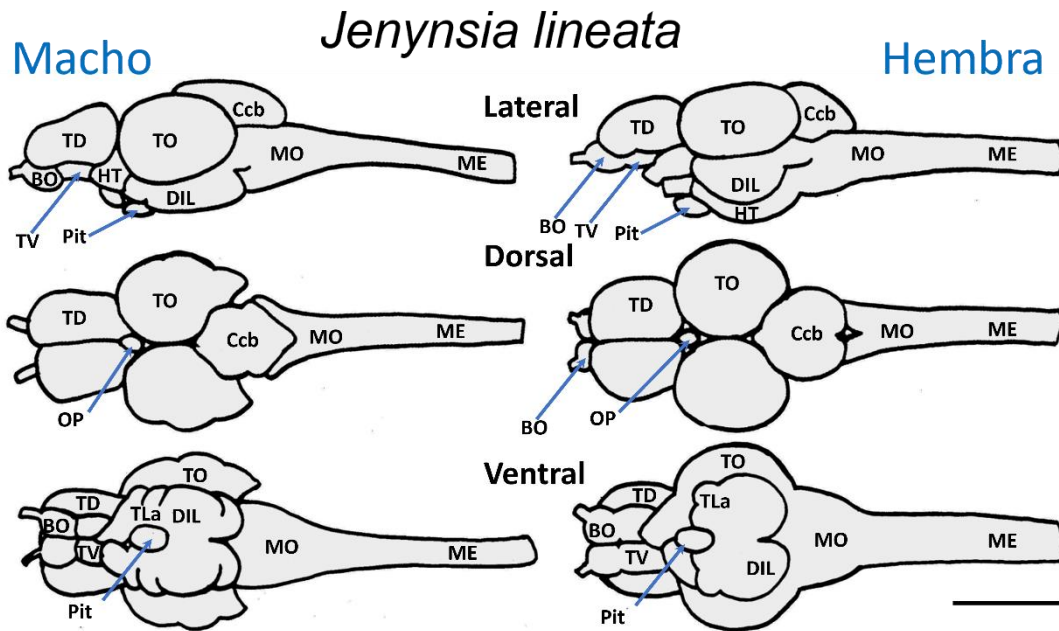
### *Jenynsia lineata*

---

Encéfalo rodeado de tejido adiposo. Compacto en sentido anteroposterior, no presenta separaciones interhemisféricas en el plano sagital en el telencéfalo y mesencéfalo (Fig 5). Lóbulos telencefálicos dorsales (TD) oblongos anteroposteriormente. Más comprimido en machos que en hembras. Telencéfalo ventral (TV) alto, adosado completamente sin separación ventricular, unido completamente en su parte anterior a los bulbos olfatorios (BO) y posteriormente al hipotálamo (HT) sin presencia de ventrículos entre estos. Bulbo olfatorio en forma de esfera, no sobrepasando el borde distal anterior del telencéfalo. Nervios olfatorios (NOlf) bien desarrollados. Hipotálamo bien desarrollado, sobrepasando en vista lateral el borde distal inferior del lóbulo inferior diencefálico (DIL) en las hembras.

*Tectum* (TO) con gran dimorfismo sexual, como dos casquetes esféricos en hembras, e irregular con dos surcos laterales en vista dorsal en machos, que presentan el borde distal posterior en punta, separado del resto de las estructuras encefálicas. DIL con dimorfismo sexual, presentando en vista ventral dos surcos, uno anterior y otro posterior que limita marcadamente al *torus lateralis* en machos. Cerebelo sexualmente dimórfico. *Corpus cerebelli* (Ccb) alargado en sentido anteroposterior proyectándose hasta la mitad del *tectum* en machos, compacto en

hembras, en posición dorsoposterior al *tectum*. Médula oblonga (MO) robusta anteriormente, afinándose posteriormente formando la médula espinal (ME).



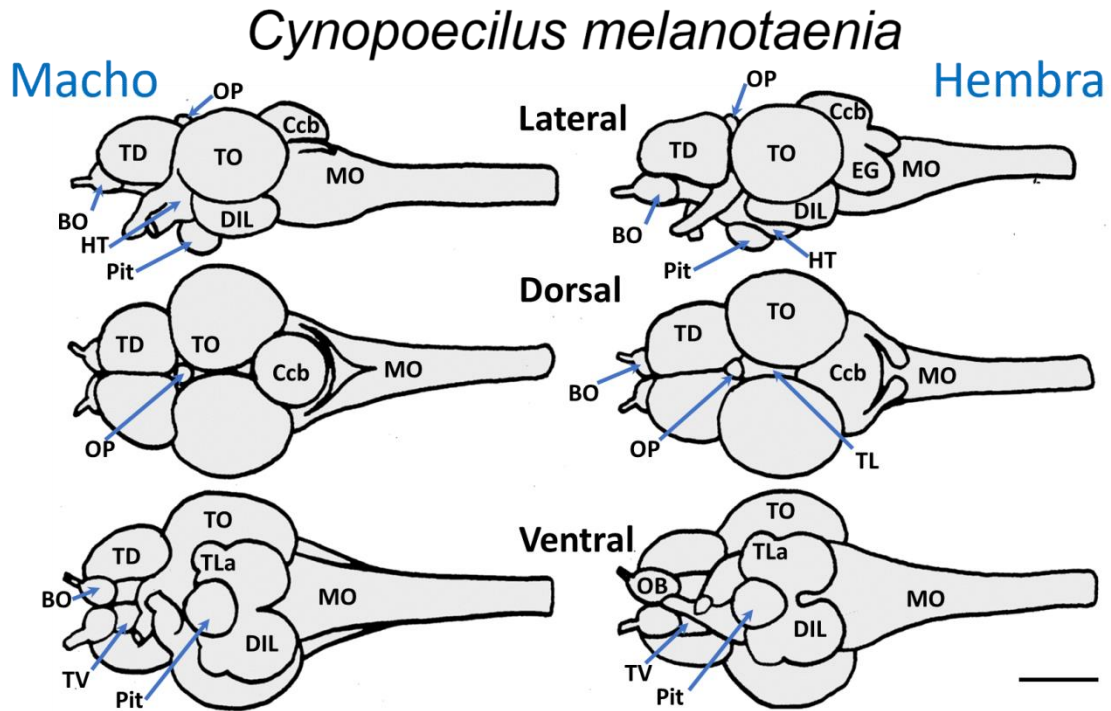
**Figura 5.** Esquema de encéfalo de *Jenynsia lineata*. Macho (izquierda) y hembra (derecha) en vistas lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfactorio. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. HT: hipotálamo. ME: médula espinal. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencefalo dorsal. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencefalo ventral. Barra = 2,5 mm.

### *Cynopoecilus melanotaenia*

El encéfalo de los individuos de esta especie presenta, al igual que en *J. lineata*, una compactación evidente entre sus estructuras, presentando poco espacio interhemisférico (Fig. 6). De este modo se presentan los hemisferios telencefálicos (TD, TV y BO) sin ventrículo medial evidente. Desde la vista dorsal, los lóbulos telencefálicos dorsales presentan un afinamiento rostral, dando lugar a una morfología triangular y, en vista lateral, el macho presenta morfología oval mientras que en la hembra es irregular. El TV se aprecia desde el lateral más pronunciado en la hembra que en el macho. En dirección anterior presenta una unión completa con los BO y caudalmente



se une de forma continua y sin formar ventrículos con las estructuras más rostrales del hipotálamo. El BO del macho presenta morfología esférica mientras que en la hembra es levemente ovoidea en sentido anteroposterior. Los nervios olfatorios son delgados y emergen de la región medial de cada BO, lateralizándose en su trayecto. El hipotálamo presenta un desarrollo moderado respecto a *J. lineata* siendo más prominente ventralmente en la hembra. El *tectum* se presenta como dos casquetes esféricos en vista lateral y en vista dorsal se aprecia cómo en el macho están apenas en contacto en la zona medial, dificultando la visualización del *torus longitudinalis*. Sin embargo, en la hembra no hay contacto medial por lo que se puede observar el *torus longitudinalis* en toda su extensión. El órgano pineal presenta buen desarrollo, pero no se alcanza a entremezclar con las meninges ni estar en contacto con el cráneo. El lóbulo inferior diencefálico en el macho se presenta como una estructura ovoide en vista lateral, mientras que en la hembra es irregular y oblonga. Desde la vista ventral, en ambos sexos se aprecia con morfología unilobular y adosado al *torus lateralis*, que presenta un buen desarrollo. El cerebelo presenta gran dimorfismo sexual: en el macho el *corpus cerebelli* presenta morfología esférica y de fácil diferenciación del resto de las estructuras cerebelosas. En la hembra, en cambio, son la *crista cerebelli* y eminencia granular las que presentan buen desarrollo lateral. La médula oblonga no presenta grandes diferencias entre sexos, siendo una estructura robusta rostralmente, afinándose para formar la médula espinal que continúa posteriormente.

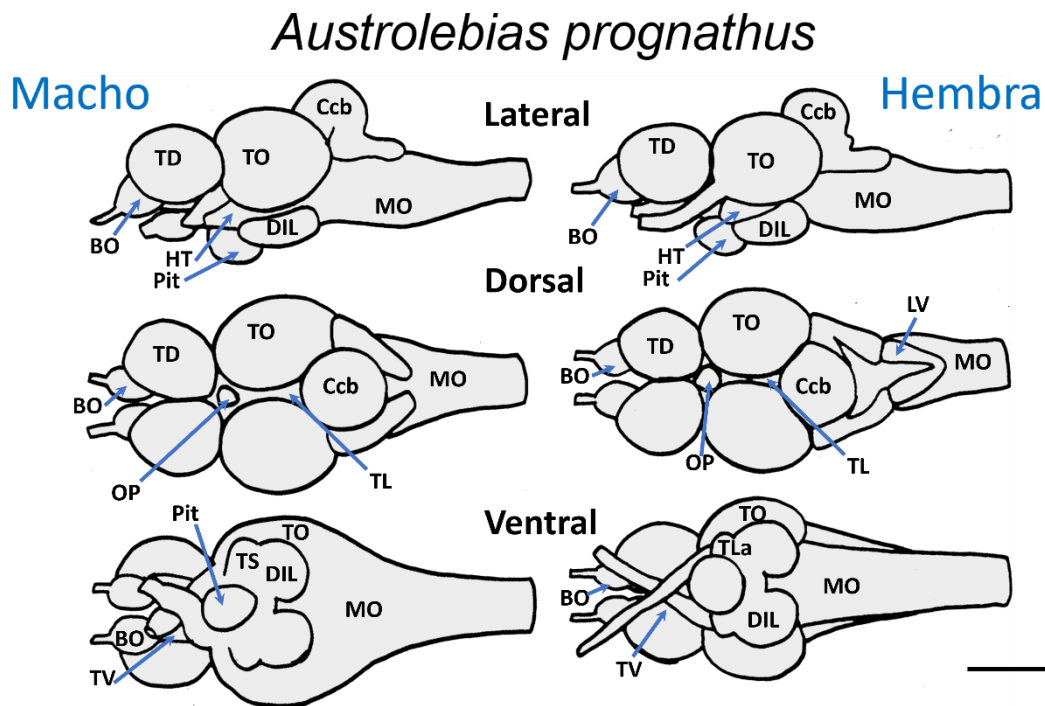


**Figura 6.** Dibujos del encéfalo de *Cynopoecilus melanotaenia* macho (izquierda) y hembra (derecha) en vistas lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. EG: eminencia granular. HT: hipotálamo. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra = 2,5 mm.

### *Austrolebias prognathus*

El encéfalo de esta especie (Fig. 7) se presenta en la cavidad craneana dejando espacios entre el tejido nervioso y los huesos, pero en estos espacios no se constató tejido adiposo como en *J. lineata*. Además, en esta especie se observan la mayoría de las estructuras pares contralaterales, separadas medialmente. El TD no mostró grandes diferencias entre sexos, presentando morfología oval en vistas dorsal y lateral. Ambos hemisferios del TD en contacto en la porción posterior, separados en la porción anterior. De esta forma, en la parte más rostral están separados dejando un gran espacio donde se pueden visualizar bien desde dorsal, los bulbos olfatorios. Los BO en ambos sexos se presentan como estructuras ovoides, separadas entre sí y con buen desarrollo relativo

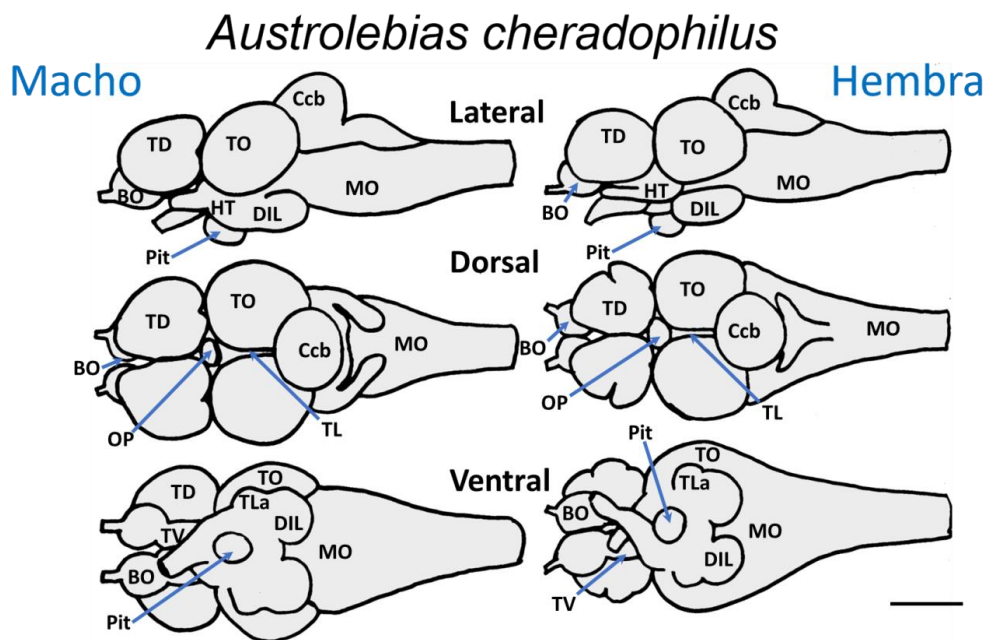
del nervio olfativo. Telencéfalo ventral aplanado y adosado al TD. Hipotálamo poco desarrollado. Lóbulo inferior pequeño, morfología esférica y con gran separación caudal entre sus partes contralaterales. *Torus lateralis* prominente. El TO es esférico y con separación medial dorsal, visualizando en ambos sexos el *torus longitudinalis*. Los nervios ópticos presentan gran desarrollo y decusan hacia la parte media del telencéfalo en la hembra y a nivel diencefálico en el macho (n=1). El órgano pineal desarrollado, esférico, no protruye por encima del encéfalo. El cerebelo es similar entre sexos con desarrollo dorsal prominente. Médula oblonga robusta, sin diferencias entre sexos. El lóbulo vagal de la hembra con buen desarrollo, morfología de "V" clásica y comisura caudal.



**Figura 7.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias prognathus* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. HT: hipotálamo. LV: lóbulo vagal. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra de calibración: 3,9 mm.

## *Austrolebias cheradophilus*

El encéfalo de *A. cheradophilus* (Fig. 8), al igual que en *A. prognathus*, no ocupa todo el espacio de la cavidad craneana dejando un espacio entre el tejido nervioso y el cráneo. Este espacio no posee tejido adiposo linfático como en *J. lineata*. Encéfalo bien definido en sus divisiones mayores, con separaciones mediales. Telencéfalo dorsal ovoide en ambos sexos, dorsalmente triangulares y en la hembra con surco lateral bien definido. Hemisferios del TD con contacto caudal y separación rostral. Posteriormente contacta con el TO, mediante un surco poco pronunciado en ambos sexos. El TV, al igual que en *A. prognathus*, es aplanado y adosado al TD. Bulbo olfatorio bien desarrollado, nervios olfatorios robustos de gran desarrollo. Órgano pineal bien desarrollado, sin protruir. Hipotálamo visible desde lateral, emergiendo ventralmente el nervio óptico, bien desarrollado y decusando proximalmente. Lóbulo inferior diencefálico oblongo poco desarrollado en ambos sexos, de hemisferios bien separados. *Torus lateralis* con morfología semilunar y gran desarrollo en el macho. Ambos lóbulos del *tectum*, esféricos dorsalmente y separados medialmente. El cerebelo posee un Ccb esférico y robusto en ambos sexos. Médula oblonga robusta, sin diferencias entre sexos, continuando caudalmente con la ME.



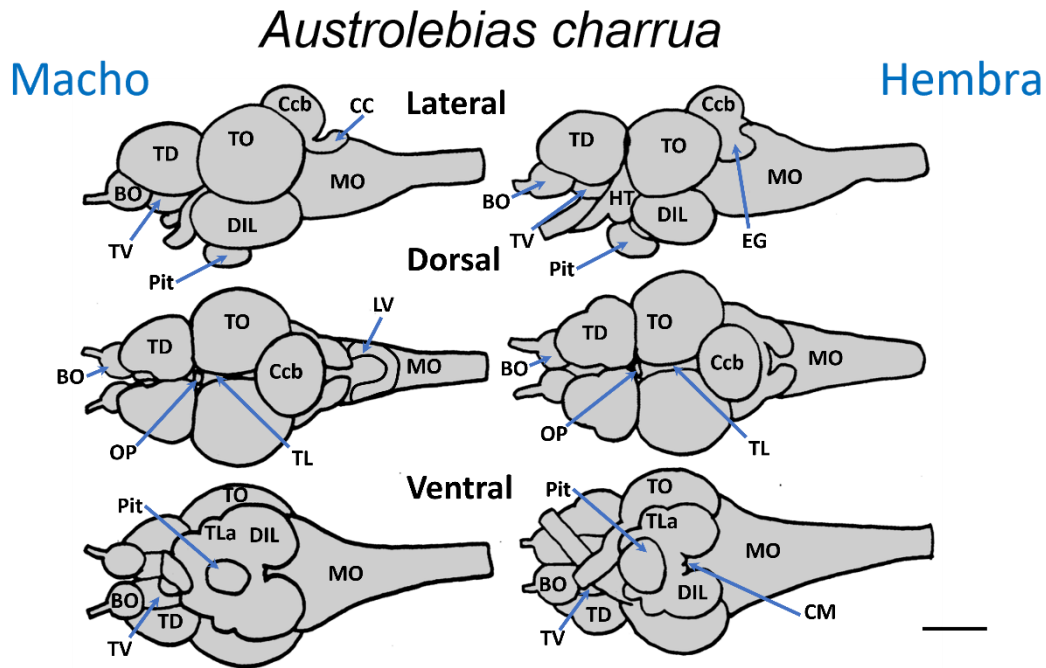
**Figura 8.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias cheradophilus* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba),

dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. HT: hipotálamo. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: Hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra de calibración: 2,6 mm.

### *Austrolebias charrua*

---

El encéfalo de *A. charrua* (Fig. 9), a diferencia del de las especies de *Megalebias*, ocupa todo el espacio de la cavidad craneana, dejando poco espacio entre el tejido nervioso y el cráneo. Esto dificulta su disección. Presenta una estructura bien definida en sus divisiones, con separación medial. Lóbulos telencefálicos ovoides lateralmente en ambos sexos, triangulares dorsalmente, con depresión lateral en la hembra no tan pronunciada como en *A. cheradophilus*. Telencéfalo dorsal en contacto caudal entre hemisferios y separados rostralmente. Área posterior con un par de surcos poco pronunciados en ambos sexos, que se continúan dorsalmente (no se esquematizan en la figura 9). Telencéfalo ventral prominente, más alto que el BO. Bulbo olfatorio de gran desarrollo, con nervios olfatorios de mediano desarrollo, dificultando su disección. Hipotálamo e hipófisis prominentes en ambos sexos. Órgano pineal poco desarrollado en ambos sexos, reduciéndose a una estructura sacular membranosa (revelada únicamente mediante la tinción con azul de metileno), extendiéndose desde la región epitalámica con forma de tubo deprimido, por la línea media hasta la mitad del TD. Lóbulo inferior diencefálico bien desarrollado respecto al de las especies de *Megalebias*, metiéndose por debajo del TO y, en machos, suele extenderse rostralmente tapando lateralmente el hipotálamo casi por completo. Ventralmente ovalado bien diferenciado del *torus lateralis*. Caudalmente con gran separación, en la hembra medialmente se aprecian los cuerpos mamilares (CM). *Tecta* esféricos dorsalmente, separados medialmente. Lateralmente esféricos en el macho, y triangulares en la hembra. Cerebelo con CCb esférico y robusto en ambos sexos, CC más notoria en el macho y EG es más notoria en la hembra. Médula oblonga medianamente robusta, con lóbulo vagal bien desarrollado en el macho, afinada caudalmente dando origen a la ME.

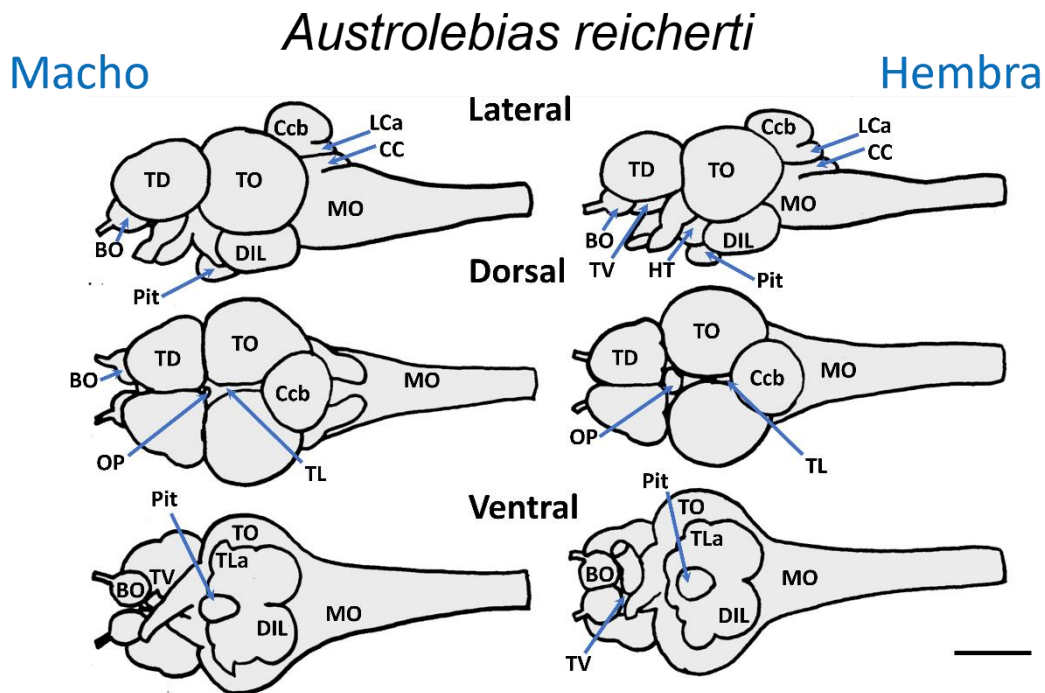


**Figura 9.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias charrua* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. CC: *crista cerebelli*. Ccb: *corpus cerebelli*. CM: cuerpos mamilares. DIL: lóbulo inferior diencefálico. EG: eminencia granular. HT: hipotálamo. LV: lóbulo vagal. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra de calibración: 2,5 mm.

### *Austrolebias reicherti*

Encéfalo muy similar al de *A. charrua* (Fig. 10). Bien definido en sus divisiones mayores, con separación medial. Sin espacios entre el tejido nervioso y el cráneo. Lóbulos telencefálicos ovoides lateralmente, triangulares dorsalmente y con depresión lateral no tan pronunciada como en el de *A. cheradophilus* hembra. Ambos hemisferios telencefálicos contactan anteroposteriormente excepto en su parte más anterior. En el contacto con el TO, presenta un par de surcos poco pronunciados en ambos sexos, que se continúan dorsalmente. Telencéfalo ventral prominente, más alto que el BO. Bulbo olfatorio bien desarrollado con nervios medianos. Hipotálamo prominente y la hipófisis de mediano desarrollo. Órgano pineal membranoso, de poco desarrollo (revelado

únicamente mediante la tinción con azul de metileno), más prominente en la hembra. Esta estructura no fue evaluada morfométricamente en ninguna de las especies para comprobar diferencias en tamaño, ya que por su escaso desarrollo no es fácil su medición. Lóbulo inferior diencefálico de gran desarrollo, metiéndose por debajo del TO. De morfología ovalada ventralmente, bien diferenciada del *torus lateralis*. Caudalmente con poca separación entre lóbulos, dificultando la visualización de los cuerpos mamilares, como ocurre en machos de *A. charrua*. *Tecta* esféricos dorsalmente y separados medialmente. Lateralmente esférico en machos y triangulado en hembras. Cerebelo con CCb esférico y robusto en ambos sexos, al igual que la CC y el lóbulo caudal (LCa). Médula oblonga medianamente robusta que se afina caudalmente dando origen a la ME.



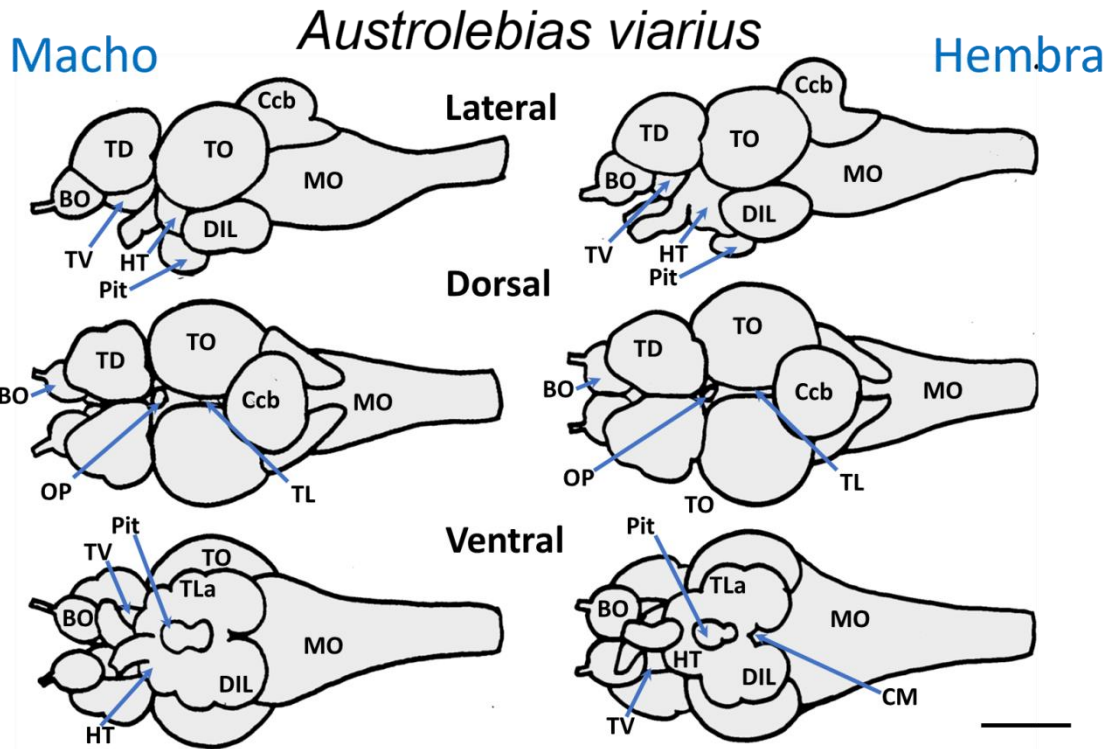
**Figura 10.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias reicherti* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. CC: *crista cerebelli*. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. HT: hipotálamo. LCa: lóbulo caudal del cerebelo. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral Barra de calibración: 2,4 mm.

## *Austrolebias viarius*

---

El encéfalo de *A. viarius* ocupa toda la cavidad craneana, bien definido en sus divisiones mayores, con separaciones mediales (Fig. 11). Lóbulos telencefálicos triangulares lateralmente, ovoides dorsalmente con surco en la parte media. Caudalmente ambos hemisferios se contactan separándose hacia la parte media, visualizándose los bulbos olfatorios y parte del TV. Presentan un par de surcos en contacto con el TO, que se continúan dorsalmente. Telencéfalo ventral prominente, más alto que el BO. Bulbo olfatorio con gran desarrollo, aparentemente mayor en proporción que en *A. charrua* y *A. reicherti* y con nervios olfatorios de mediano desarrollo. En la hembra es más voluminoso que en el macho y no presenta separación medial. Hipotálamo muy prominente en ambos sexos, con protrusión anterior y lateral. Esta protrusión lateral es más evidente en machos en la vista ventral. Hipófisis bilobulada (sin separación anatómica) en ambos sexos, con un lóbulo anterior de coloración blanquecina y un lóbulo caudal de aspecto traslúcido respecto al anterior. Estas apariencias de coloración se dan tanto en tejido fresco como en el tejido fijado. Órgano pineal poco desarrollado, un poco más organizado estructuralmente que en *A. charrua* y *A. reicherti*, pero no tan robusto como en especies de *Megalebias* ni en *C. melanotenía* y *J. lineata*. Lóbulo inferior diencefálico con desarrollo intermedio respecto a los de *A. charrua*, *A. reicherti* y las especies de *Megalebias*, de morfología ovalada ventralmente y bien diferenciado del *torus lateralis*. Caudalmente con lóbulos separados, con poco espacio medial en el macho y amplio en la hembra visualizándose los cuerpos mamilares (CM). *Tecta* esféricos dorsal y lateralmente, separados en la línea media. En vista lateral se aprecia cómo se relacionan íntimamente en su parte anterior con el telencéfalo sin dejar espacio entre ambas estructuras. Cerebelo con Ccb esférico y robusto en la hembra, dorsalmente triangulado en el macho. Médula oblonga muy robusta en comparación con las demás *Austrolebias* y se afina caudalmente dando origen a la ME.



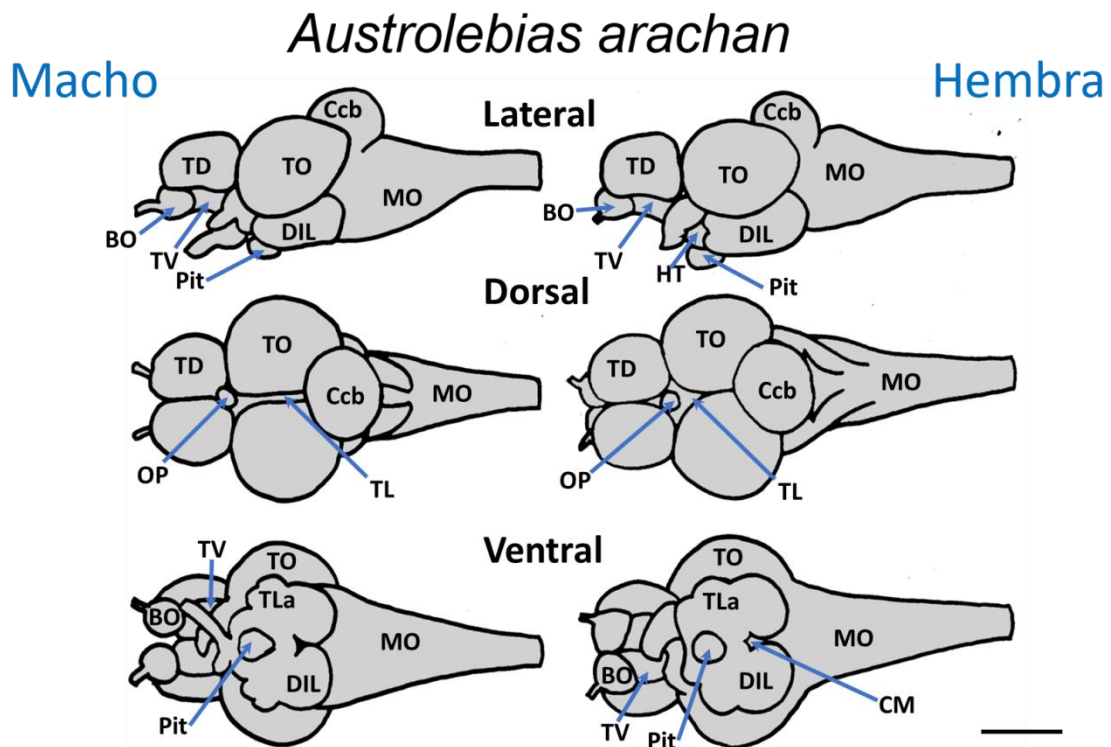


**Figura 11.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias viarius* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. CM: cuerpos mamilares. DIL: lóbulo inferior diencefálico. EG: eminencia granular. HT: hipotálamo. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: Hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra de calibración: 2,5 mm.

### *Austrolebias arachan*

Encéfalo que ocupa toda la cavidad craneana. Compacto y bien definido en todas sus divisiones mayores, con poca separación medial entre las estructuras pares contralaterales (Fig. 12). Lóbulos telencefálicos oblongos lateralmente y ovoides dorsalmente. Hemisferios del TD sin separación medial rostral, pero sí caudal, sobre todo en la hembra. Telencéfalo ventral prominente, alto como el BO. Bulbo olfatorio de gran desarrollo y nervios olfatorios medianos. En la hembra ambos BO sin ventrículo medial, similar a lo observado en *A. charrua*, *A. reicherti* y *A. arachan*. Hipotálamo muy

prominente en ambos sexos, con protrusión rostral y lateral. Órgano pineal poco desarrollado como en *A. viarius*; un poco más organizado estructuralmente que en *A. charrua* y *A. reicherti*, pero no tan robusto como en especies de *Megalebias* ni en *C. melanotaenia* y *J. lineata*. Lóbulo inferior diencefálico de gran desarrollo, similar a los de *A. charrua* y *A. reicherti*. De morfología ovalada ventralmente, sin surcos y bien diferenciado del *torus lateralis*. Con separación media caudal, con cuerpos mamilares poco visibles en la hembra. *Tecta* esféricos dorsalmente, separados medialmente en el macho, mientras que en la hembra esta separación se da sólo rostralmente. Lateralmente, son esféricos en la hembra y esferoide con un ángulo dorso-caudal en el macho. Cerebelo con Ccb esférico y robusto en ambos sexos, lateralmente las demás estructuras no se resuelven con claridad. Dorsalmente, el límite posterior de la CC es más notoria en el macho que en la hembra, mientras que, en esta última, se aprecia bien la estructura rómbica del cuarto ventrículo. Médula oblonga muy robusta en comparación con las demás *Austrolebias* y se afina caudalmente dando origen a la ME.



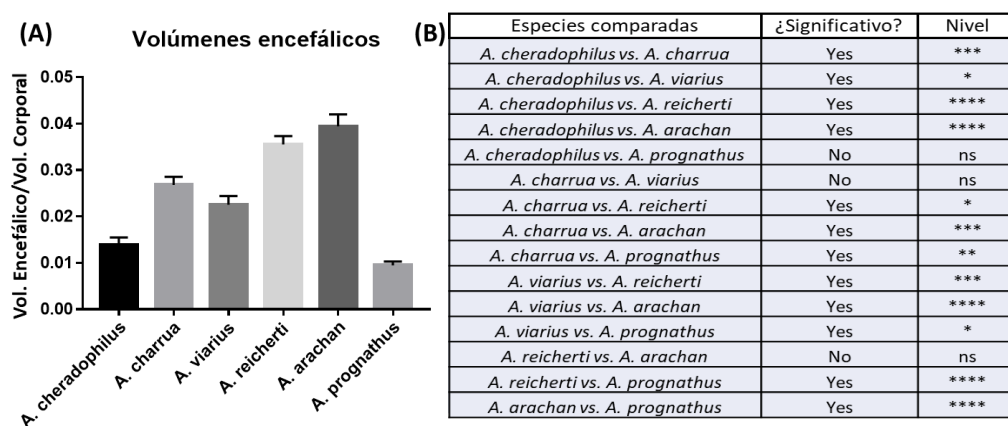
**Figura 12.** Dibujos del encéfalo de *Austrolebias arachan* macho (izquierda superior, medio e inferior) y hembra (derecha superior, medio e inferior) en vista lateral (arriba), dorsal (medio) y ventral (abajo). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. CM: cuerpos

mamilares. DIL: lóbulo inferior diencefálico. HT: hipotálamo. MO: médula oblonga. OP: órgano pineal. Pit: hipófisis. TD: telencéfalo dorsal. TL: *torus longitudinalis*. TLa: *torus lateralis*. TO: *tectum*. TV: telencéfalo ventral. Barra de calibración: 2,5mm.

## 3.2. Anatomía comparada

### *Volúmenes encefálicos: comparación entre especies*

Si bien en la aproximación preliminar se vio que los tamaños encefálicos varían entre especies, es necesario ver si esas diferencias se constatan estadísticamente. Para ello se aplicaron tests para verificar si existen diferencias significativas en el volumen encefálico relativo al volumen corporal entre diferentes especies de *Austrolebias* (Fig. 13). Mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y posterior comparación de la media y error estándar se constató que sí existen diferencias significativas entre especies ( $\alpha=0,05$ ). Estas diferencias se dieron en la mayoría de las combinaciones de especies a diferentes niveles de significación estadística, excepto en los pares: *A. cheradophilus*-*A. prognathus*, *A. charrua*-*A. viarius* y *A. reicherti*-*A. arachan*.

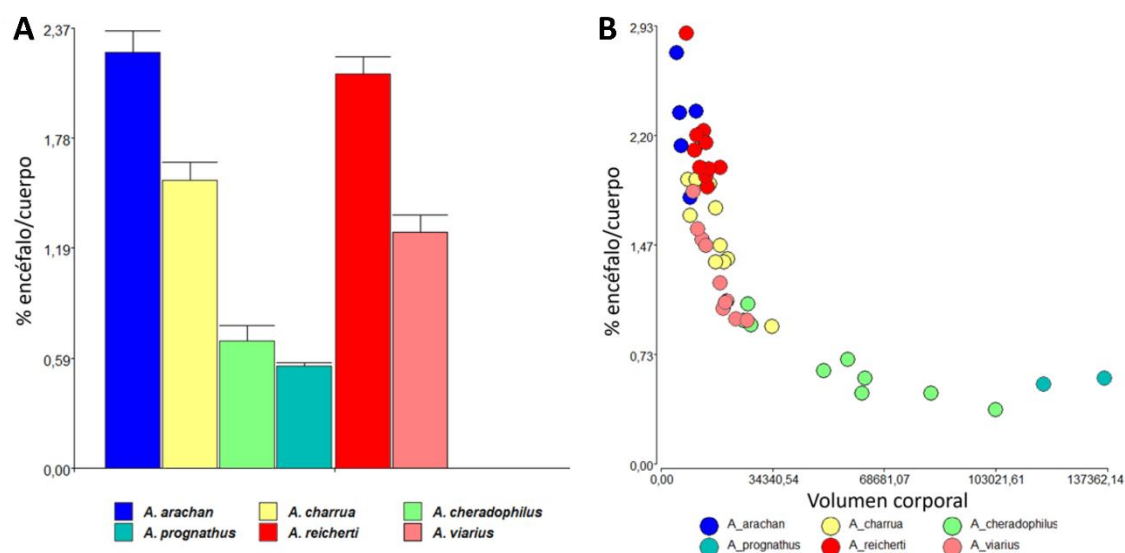


**Figura 13.** Comparación entre especies del volumen encefálico respecto al volumen corporal en *Austrolebias*. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de los volúmenes encefálicos de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel de significación, en la

segunda y tercera columna, respectivamente. ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

### Volumen encefálico respecto al volumen corporal

*Austrolebias arachan* y *A. reicherti* son las especies que poseen un tamaño encefálico relativo mayor, *A. charrua* y *A. viarius* un porcentaje intermedio mientras que las especies del subgénero *Megalebias* registran menores porcentajes encefálicos entre las especies estudiadas (Fig. 14).

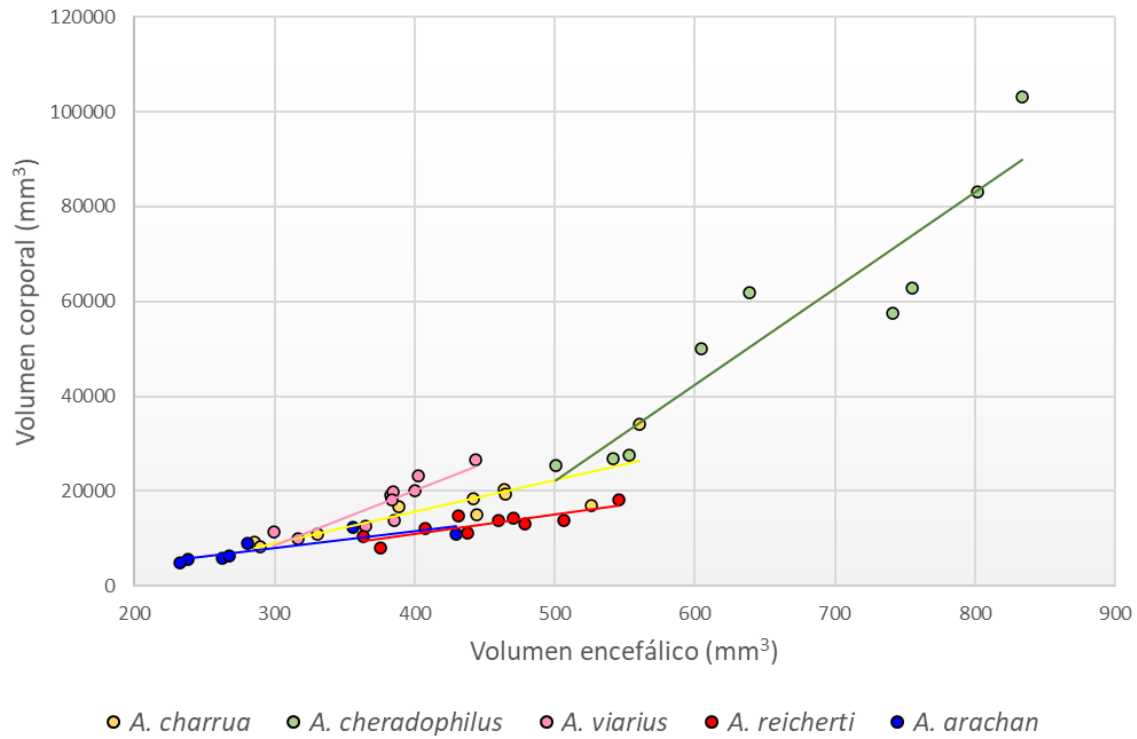


**Figura 14.** Porcentaje del volumen encefálico respecto al volumen corporal en *Austrolebias*. En A se muestran los valores promedios y varianza del porcentaje del volumen encefálico respecto al volumen corporal. En B se muestra la nube de puntos de la distribución de los valores de A respecto a los volúmenes corporales.

### Correlaciones de volúmenes encefálicos respecto al cuerpo

Para el análisis de correlación entre volúmenes se utilizaron las especies de *Austrolebias* que son las de interés en este trabajo, excepto *A. prognathus* debido al bajo número de individuos disponibles ( $n=2$ ). Esta especie fue incluida en otros análisis subsiguientes a sabiendas de que serán tomados como una aproximación a su conocimiento. En todas

las especies analizadas en este estudio, se constató una correlación positiva entre el volumen encefálico y el volumen corporal ( $r$  mayor a 0,72;  $p < 0,05$ ). A continuación, se muestra la gráfica (Fig. 15) de las correlaciones para cada especie.



**Figura 15.** Correlación lineal de volumen encefálico respecto al volumen corporal en *Austrolebias*. La gráfica muestra una correlación positiva ( $p < 0,05$ ) para el volumen encefálico y el volumen corporal de *Austrolebias* en milímetros cúbicos.

### *Correlaciones de volúmenes de estructuras encefálicas respecto al volumen encefálico total (VET)*

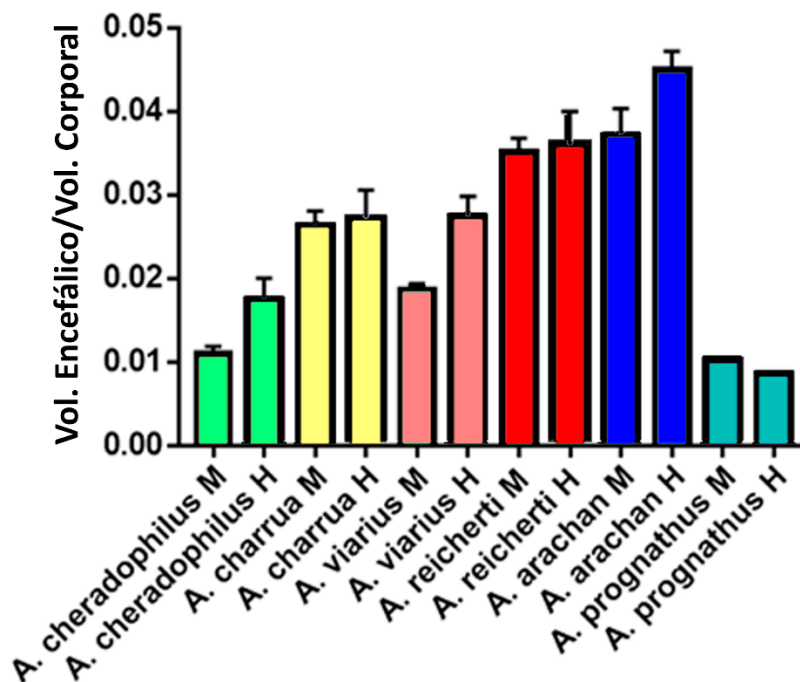
Se analizó si las estructuras encefálicas cuyos volúmenes estimamos están correlacionadas al VET con el objetivo de evaluar si el aumento de tamaño es proporcional o no en sus estructuras. Las estructuras analizadas fueron el telencéfalo dorsal (TD), bulbo olfatorio (BO), *tectum* (TO), lóbulo inferior diencefálico (DIL) y *corpus cerebelli* (Ccb). *Austrolebias charrua* posee una correlación negativa únicamente para el DIL ( $r = -0.7656$ ;  $p = 0.0098$ ). En tanto en *A. cheradophilus*, *A. viarius*, *A. reicherti* y *A.*

*arachan* no se encontró ninguna correlación en las variables analizadas. En los grupos externos, en *J. lineata* el DIL se correlacionó negativamente con el VET ( $r=-0.8303$ ;  $p=0.0047$ ) y en *C. melanotaenia* el Ccb se correlacionó positivamente con el VET ( $r=0.6848$ ;  $p=0.0347$ ).

### *Volúmenes encefálicos: comparación entre sexos*

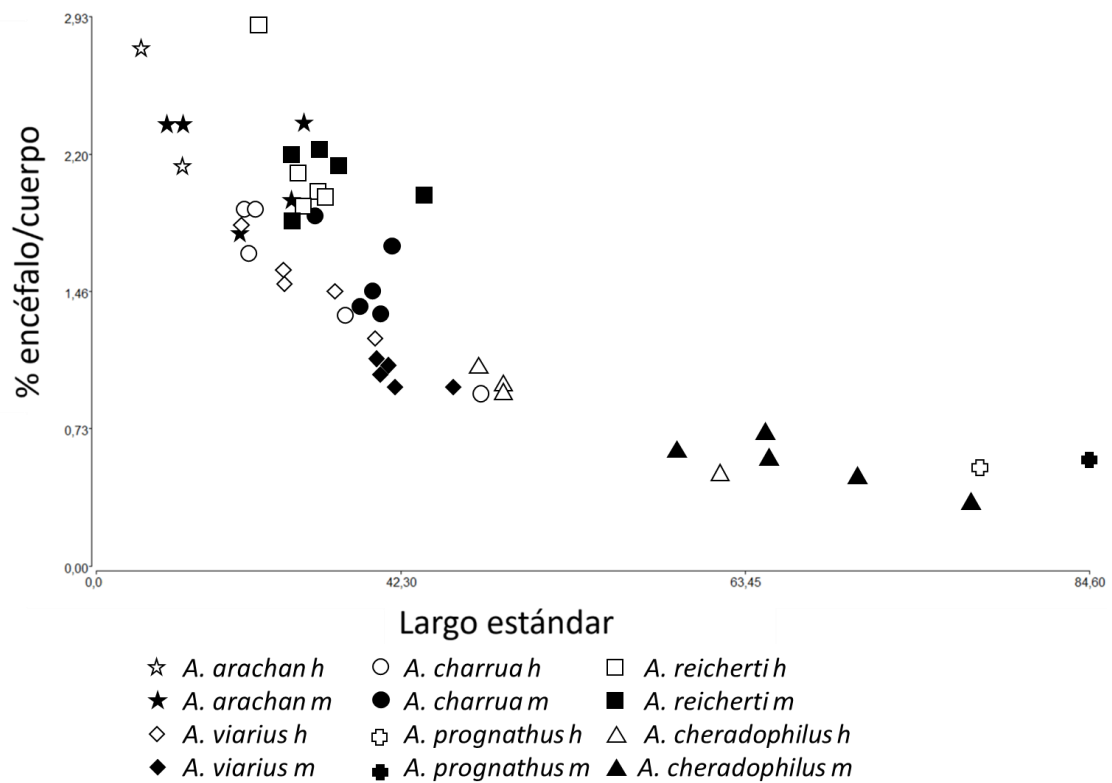
Para determinar si existen diferencias significativas en el tamaño encefálico entre sexos, se realizó una comparación para cada especie de *Austrolebias* estudiada en este trabajo. Mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y posterior comparación de la media y error estándar se constató que, aunque visualmente los volúmenes de las hembras parecen ser mayores que los de los machos, no hay diferencias significativas de que la hembra posea un volumen encefálico, relativo al volumen corporal, mayor que en machos (Fig. 16).

**Volúmenes encefálicos relativizados en *Austrolebias***



**Figura 16.** Comparación entre sexos del volumen encefálico respecto al volumen corporal en *Austrolebias*. La gráfica expresa la media y el error estándar de los volúmenes encefálicos de machos y hembras de cada especie de *Austrolebias* estudiada. No se registraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) para ninguna de las especies. M= macho, H= hembra

En virtud de conocer si el tamaño del encéfalo varía respecto del tamaño corporal y cómo se comporta esta variación, se utilizó un análisis de correlación lineal de volúmenes y del largo estándar corporal. Cuando se compara la distribución del porcentaje de volúmenes encefálicos respecto al largo estándar corporal en función del largo estándar para cada sexo, vemos que no varía el patrón general observado anteriormente (vol. encefálico vs vol. corporal) en que, a medida que es mayor el largo estándar corporal, menor es el tamaño encefálico porcentual (Fig. 17).



**Figura 17.** Porcentaje del encéfalo respecto al cuerpo en función del largo estándar corporal. La nube de datos refleja el patrón observado anteriormente en el cual, a mayor largo estándar, menor porcentaje del volumen encefálico respecto al volumen corporal. m= macho, h= hembra.

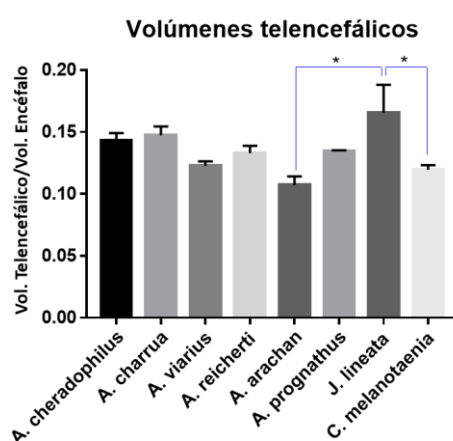
## Volúmenes de las estructuras encefálicas: comparación entre sexos

Los volúmenes de las diferentes estructuras encefálicas relativas al volumen encefálico para cada sexo fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y posterior comparación de la media y desvío. Las diferentes estructuras encefálicas de las que se pudieron hallar los volúmenes no presentaron diferencias significativas entre sexos.

## Volúmenes de las estructuras encefálicas: comparación entre especies

Los volúmenes de las diferentes estructuras encefálicas relativas al volumen encefálico fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y posterior comparación de la media y error estándar. Este análisis se realizó para las especies de *Austrolebias* seleccionadas para este estudio y para las especies de los grupos hermanos externos.

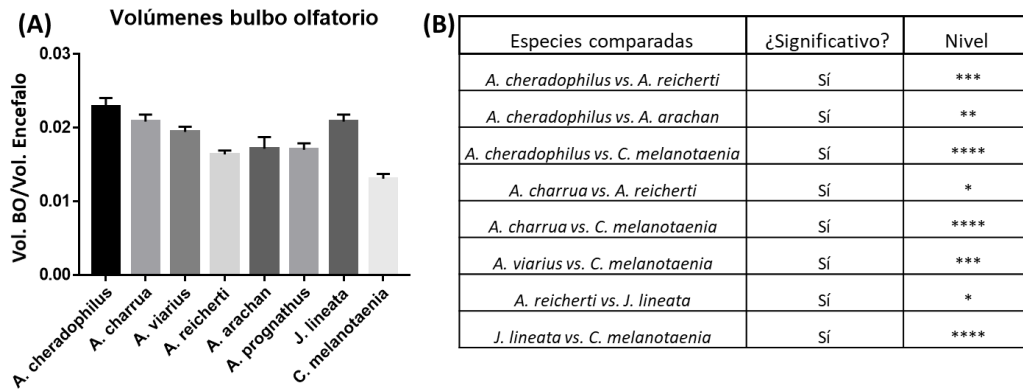
El telencéfalo dorsal no presentó diferencias significativas entre especies de *Austrolebias* (Fig. 18), pero sí entre *A. arachan* y *J. lineata* y entre *C. melanotaenia* y *J. lineata*, siendo mayor significativamente en *J. lineata* respecto las otras ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18.** Volumen telencefálico relativo al volumen encefálico. Se muestran los valores de la media y el error estándar para cada especie. Las únicas especies que presentaron diferencias significativas son *J. lineata* con *A. arachan* y *C. melanotaenia* (\*:  $P < 0,05$ ).

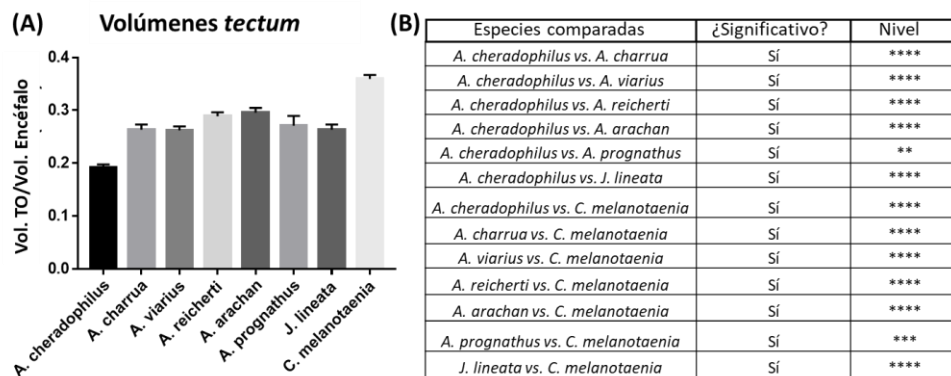


El bulbo olfatorio presentó diferencias significativas entre 8 pares de especies (Fig. 19) siendo *A. cheradophilus* la especie que más diferencias registró y la que posee el tamaño relativo más grande, seguido por *J. lineata* y *A. charrua*.



**Figura 19.** Volumen del bulbo olfatorio relativo al volumen encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significación, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

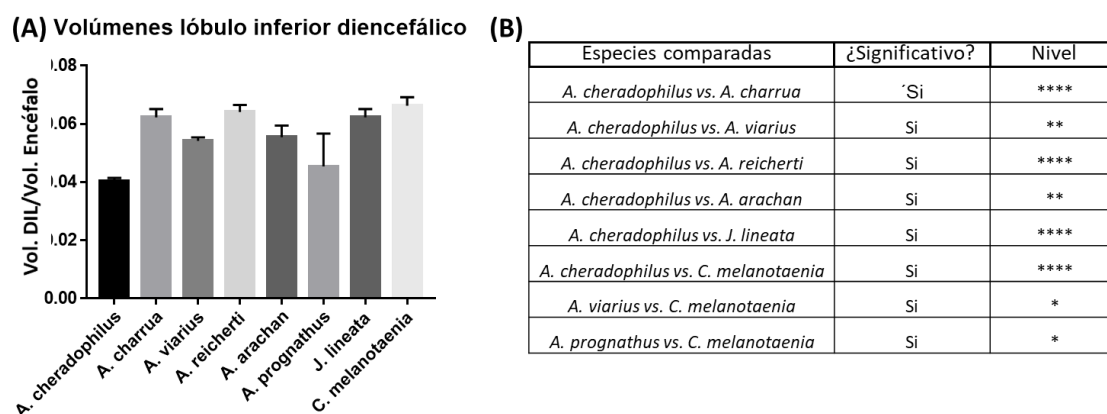
Con respecto al *tectum*, esta estructura presentó diferencias estadísticamente significativas entre 13 pares de especies comparadas. En *A. cheradophilus* presentó el menor tamaño y fue menor que en el resto de las especies (Fig. 20). Por el contrario, *C. melanotaenia* presentó el tamaño más grande frente al resto de las especies estudiadas. El resto de las especies no presentaron diferencias entre sí.



**Figura 20.** Volumen del *tectum* relativo al volumen encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies

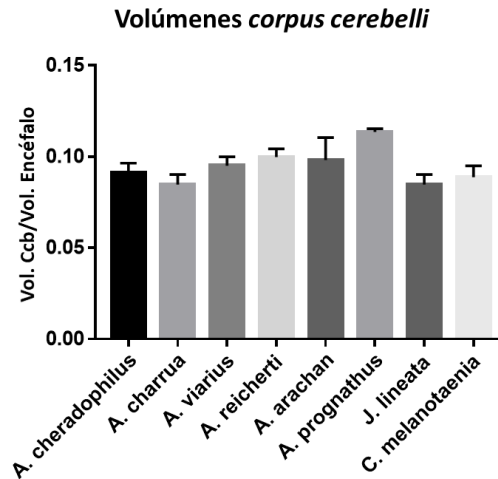
comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significación, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

El lóbulo inferior diencefálico de *A. cheradophilus* fue significativamente menor que el del resto de las especies analizadas (Fig. 21) excepto el de su compañera de género *A. prognathus* ( $n=2$ ). En *C. melanotaenia* registró mayor volumen relativo, presentando diferencias estadísticas con *A. cheradophilus*, *A. viarius* y *A. prognathus*. El resto de las especies no presentan diferencias entre sí.



**Figura 21.** Volumen del lóbulo inferior diencefálico relativo al volumen encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significación, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

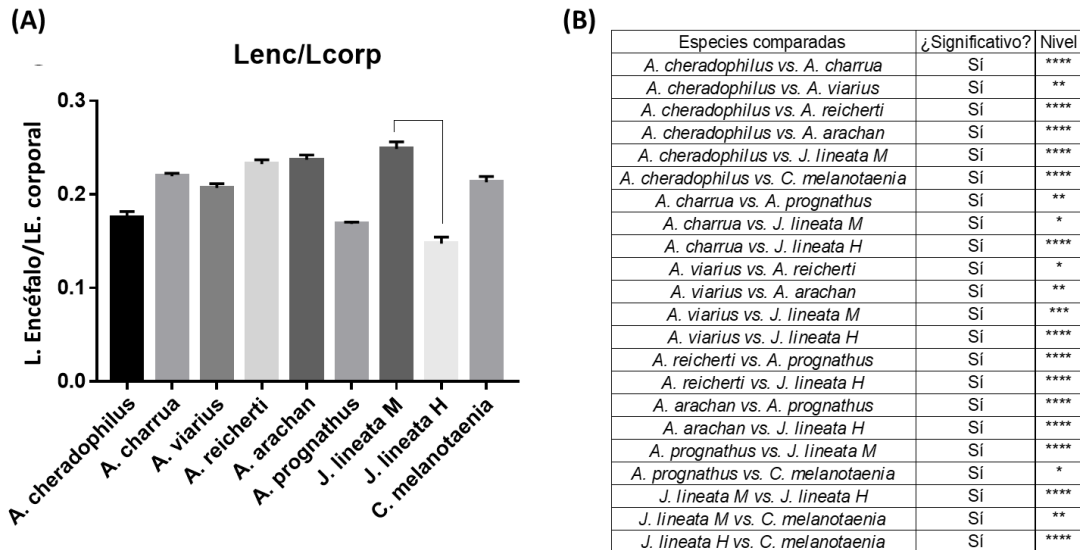
En cuanto al *corpus cerebelli*, no presentó diferencias significativas para ninguna de las especies analizadas (Fig. 22).



**Figura 22.** Volumen del *corpus cerebelli* relativo al volumen encefálico. Se muestran los valores de la media y el error estándar para cada especie. No se registraron diferencias significativas entre especies (todos  $P > 0,05$ ).

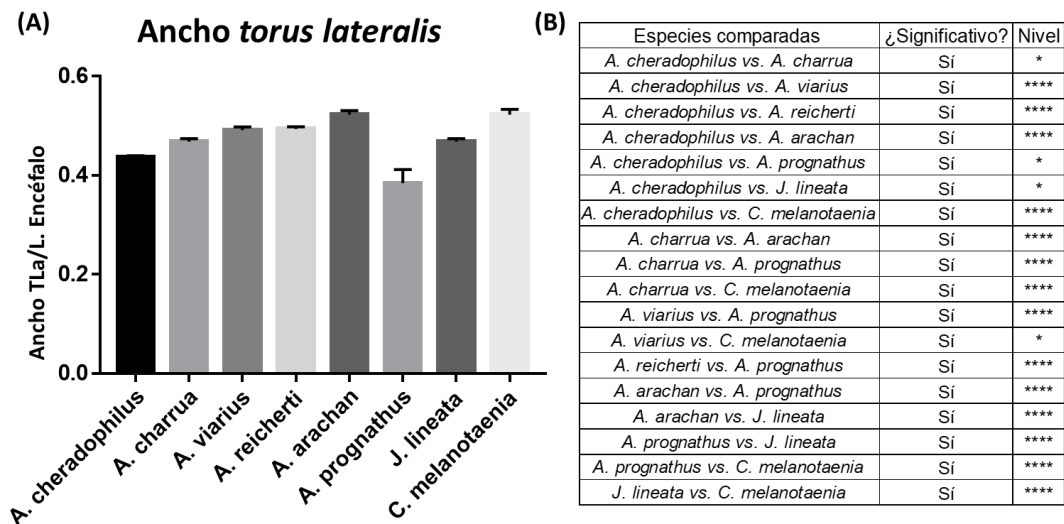
### *Análisis de morfometría lineal*

Para el primer análisis utilizamos el largo estándar encefálico relativizado al largo estándar corporal entre sexos y entre especies, encontrando diferencias sexuales en *J. lineata* ( $p < 0,05$ ) pero no entre las demás especies. Comparando entre especies, *J. lineata* macho posee mayor largo estándar encefálico que el resto de las especies, seguido por *A. arachan*, *A. reicherti* y *A. charrua* con las que no presentó diferencias significativas. *J. lineata* hembra registra el menor largo encefálico presentando diferencias significativas con las demás especies, excepto con las del subgénero *Megalebias* (Fig. 23).



**Figura 23.** Largo estándar encefálico relativo al largo estándar corporal. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel de significación en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

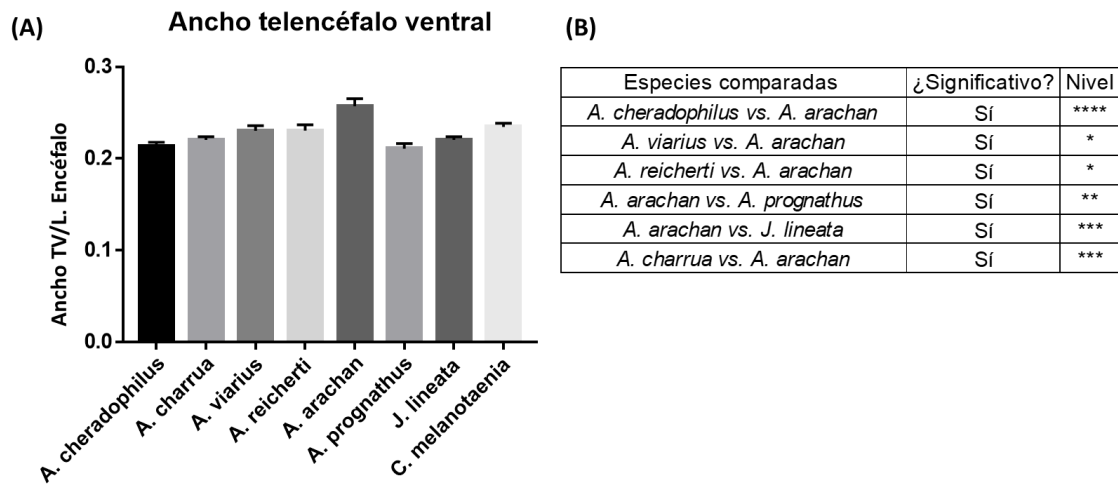
El ancho del *torus lateralis* presentó gran variación entre especies, pero no entre sexos. *A. prognathus*, *A. cheradophilus* y *J. lineata* registraron los valores menores, mientras que *A. arachan* presentó el mayor valor (Fig. 24).



**Figura 24.** Ancho del *torus lateralis* relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de

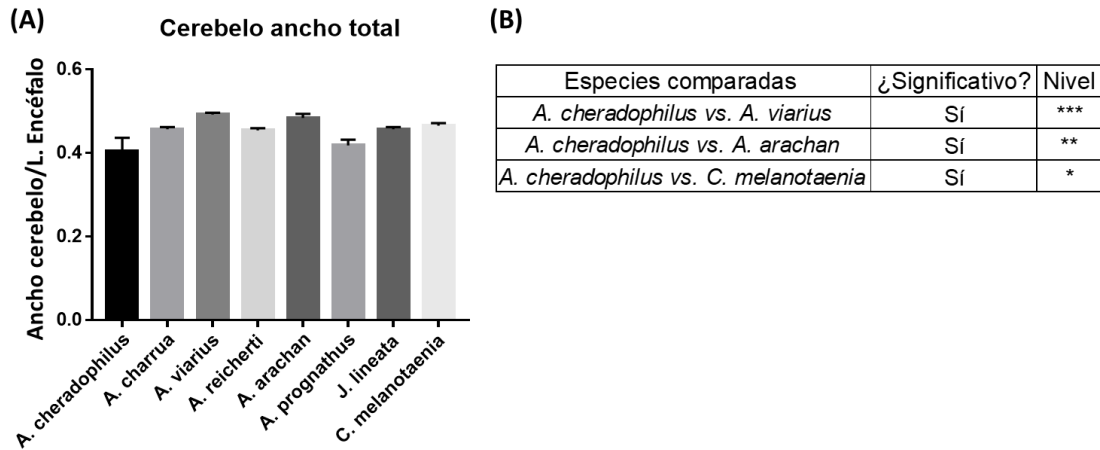
especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

El ancho del telencéfalo ventral es bastante homogéneo entre especies, presentando el mayor valor *A. arachan*, significativamente mayor que en la mayoría de las especies excepto *C. melanotaenia* (Fig. 25).



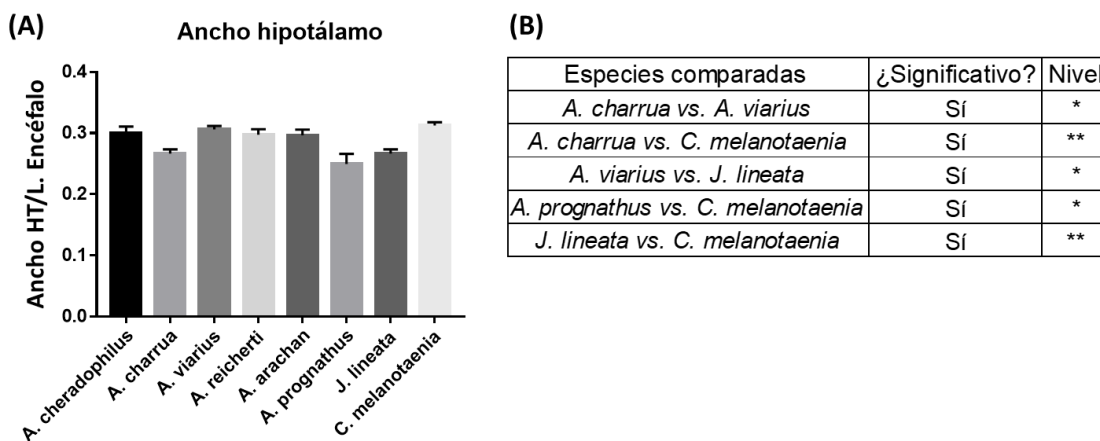
**Figura 25.** Ancho del telencéfalo ventral relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel de significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

En cuanto al ancho total del cerebelo, *A. cheradophilus* presentó el menor registro medio, siendo significativamente menor que *A. viarius*, *A. arachan* y *C. melanotaenia* (Fig. 26). El resto de las especies no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



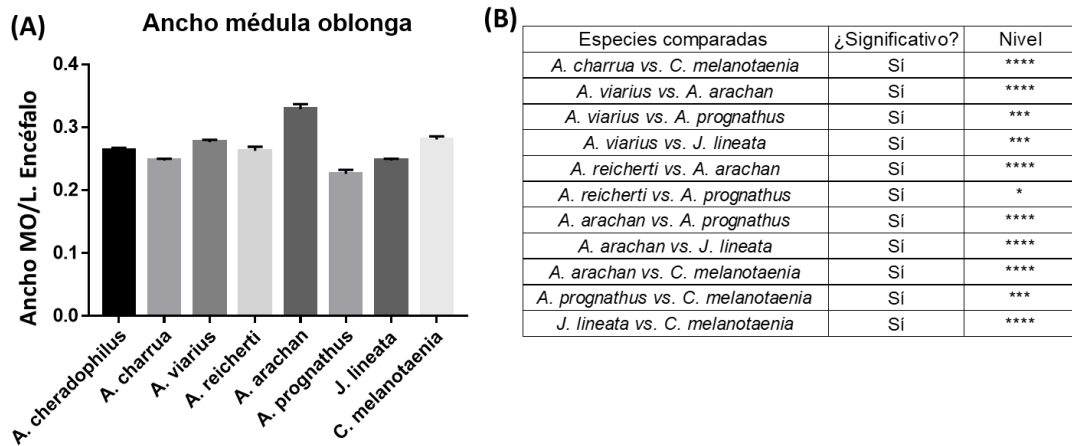
**Figura 26.** Ancho total del cerebelo relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

El ancho del hipotálamo presenta 5 pares de especies con diferencias, siendo mayor en *C. melanotaenia*. *A. charrua*, *A. prognathus* y *J. lineata* presentaron los menores valores, siendo significativamente menor en al menos una comparación entre especies (Fig. 27).



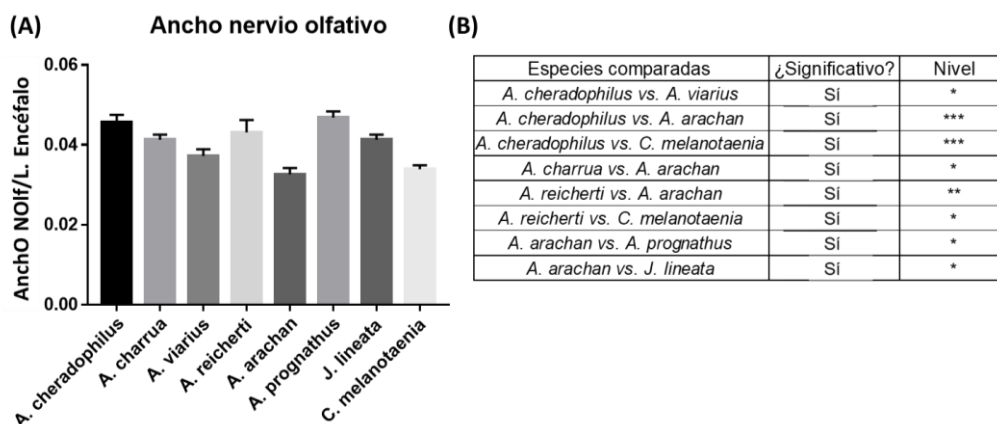
**Figura 27.** Ancho del hipotálamo relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ .

La comparación del ancho de la médula oblonga arrojó 11 pares de especies con diferencias significativas. *A. arachan* presenta el mayor ancho, siendo significativo respecto 5 especies mientras que *A. prognathus* presenta el menor registro siendo significativo respecto 4 especies (Fig. 28).



**Figura 28.** Ancho de la médula oblonga relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

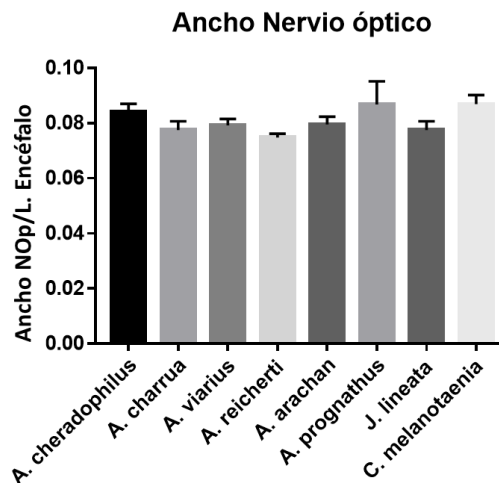
El ancho del nervio olfativo varió moderadamente presentando diferencias entre 8 pares de especies, siendo mayor en las especies de *Megalebias*. *A. arachan* registra el menor valor, siendo significativo respecto a 5 especies (Fig. 29).



**Figura 29.** Ancho del nervio olfativo relativo al largo estándar encefálico. La gráfica (A) expresa la media y el error estándar de cada especie. El recuadro (B) muestra los pares de

especies comparadas en la primera columna, seguido por el análisis estadístico y el nivel la significancia, en la segunda y tercera columna, respectivamente. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

Por último, el ancho del nervio óptico no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para ninguna de las especies analizadas (Fig. 30).



**Figura 30.** Ancho del nervio óptico relativo al largo estándar encefálico. La gráfica expresa la media y el error estándar de cada especie. No se registraron diferencias significativas entre especies (todos  $P > 0,05$ ).

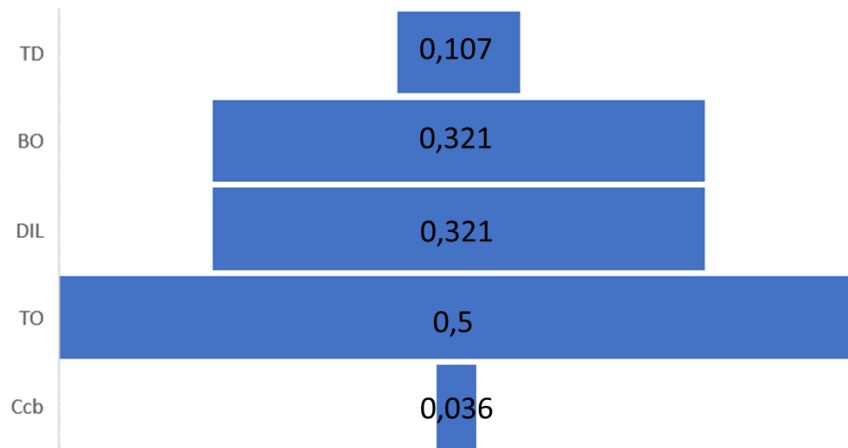
### Índices de variación de las estructuras

---

Para el análisis de los índices de variación se utilizaron los valores tanto de machos como de hembras, ya que en el análisis estadístico no resultaron con diferencias significativas, excepto para el largo estándar encefálico en *J. lineata*. Los volúmenes relativos al encéfalo de las estructuras analizadas, mostraron un aporte heterogéneo a la variación entre especies (Fig. 31) para las 28 combinaciones posibles de comparación. El *corpus cerebelli* presentó el menor índice de variación, ya que ninguna especie registró diferencias significativas. El telencéfalo dorsal varió en dos combinaciones y fue la estructura que menor índice presentó. El bulbo olfatorio y el lóbulo inferior diencefálico

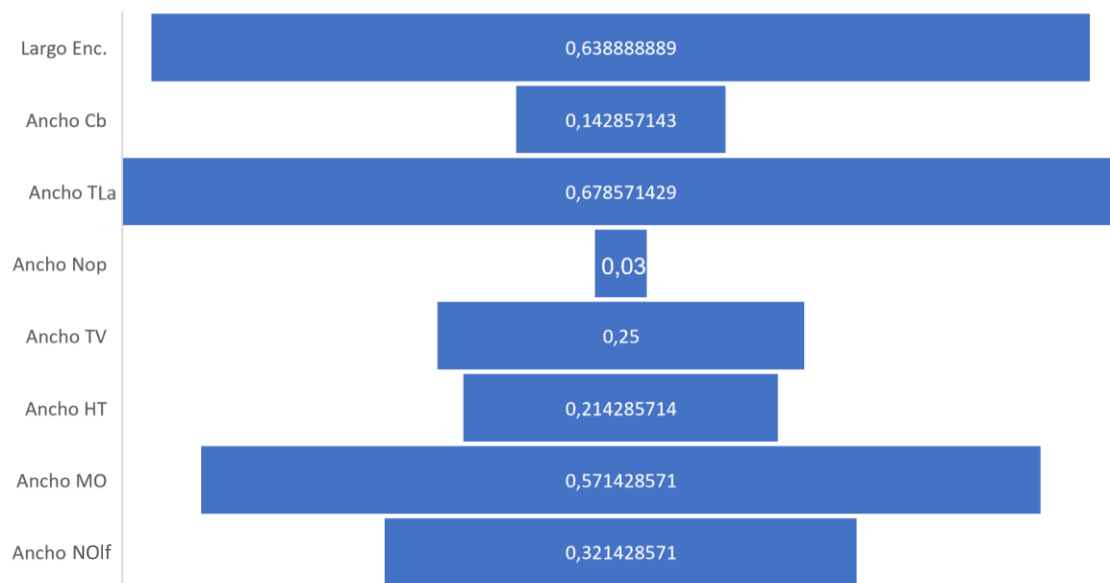


presentaron una variación intermedia, variando ambos en 8 combinaciones. El *tectum* fue la estructura que presentó más combinaciones (13) con diferencias, siendo la estructura más variable entre especies desde el punto de vista volumétrico.



**Figura 31.** Índice de variación de los volúmenes de las estructuras analizadas. La estructura que más aporta a la variación entre especies es el *tectum* (TO). BO: bulbo olfatorio. Ccb: *corpus cerebelli*. DIL: lóbulo inferior diencefálico. TD: telencéfalo dorsal.

Respecto a las mediciones lineales también hubo heterogeneidad (Fig. 32) en la variación entre especies siendo el largo encefálico, ancho del *torus lateralis* y el ancho de la médula oblonga las estructuras que mayor índice presentan. La variación del ancho del nervio óptico fue nula y el ancho del cerebelo entero, ancho del telencéfalo ventral, ancho del hipotálamo y ancho del nervio olfativo fueron bajas.



**Figura 32.** Índice de variación de las mediciones lineales de las estructuras analizadas. Las estructuras que más aporte hacen a la variación entre especies son el largo encefálico (largo Enc.), ancho del *torus lateralis* (ancho TLa) y el ancho de la médula oblonga (ancho MO). Ancho Cb: ancho del cerebelo. Ancho HT: ancho del hipotálamo. Ancho NOlf: ancho del nervio olfativo. Ancho NOp: ancho del nervio óptico. Ancho TV: ancho del telencéfalo ventral.

### 3.3. Filogenia

En esta sección se presentan las matrices de caracteres para las especies estudiadas en base a los caracteres morfológicos y morfométricos propuestos y la filogenia basada en esos caracteres encefálicos.

#### *Definición de caracteres*

Definiciones de los caracteres y estados incluidas en la matriz morfológica:

Carácter 1. Forma del Bulbo olfatorio: 0) oval; 1) esférico.

Carácter 2. Ventrículo medial en bulbo olfatorio: 0) sin ventrículo; 1) parcial; 2) completo.

Carácter 3. Superposición del telencéfalo sobre el bulbo olfatorio en vista dorsal: 0) totalmente superpuestos; 1) superposición menor al 50%; 2) superposición mayor al 50%.

Carácter 4. Forma del telencéfalo dorsal, en vista dorsal: 0) oblonga; 1) ovoidea; 2) semicircular; 3) con impresión lateral.

Carácter 5. Abertura del ventrículo telencefálico en vista dorsal: 0) ausente; 1) abertura rostral; 2) abertura caudal; 3) abertura completa.

Carácter 6. Altura del telencéfalo ventral (cualitativa, no numérica): 0) sin altura; 1) menos alto que el BO; 2) más alto que el BO.

Carácter 7. Anchura del telencéfalo ventral: 0) más fino que el BO; 1) igual que el BO; 2) más ancho que el BO.

Carácter 8. Grado de desarrollo estructural del órgano pineal: 0) poco desarrollo, membranoso tubular, translúcido no se puede disecar; 1) desarrollo intermedio, membranoso redondeado, blanquecino, no se puede disecar; 2) gran desarrollo, estructura maciza, color igual que el encéfalo, se puede disecar.

Carácter 9. Distancia del cruce de los nervios ópticos (quiasma) desde el hipotálamo: 1) cruce proximal, en inmediaciones hipotalámicas; 2) cruce distal, en inmediaciones telencefálicas.

Carácter 10. Separación dorsal del *tectum*: 0) sin separación, no permite distinguir el *torus longitudinalis* subyacente; 1) poca separación, permite ver un espacio lineal entre sus hemisferios; 2) gran separación, permite visualizar el *torus longitudinalis* con su bandeo característico.

Carácter 11. Forma del *tectum* en vista lateral: 0) oval; 1) esférico; 2) con ángulo posterior.

Carácter 12. Forma del *tectum* en vista dorsal: 0) oval; 1) morfología compleja (no oval).

Carácter 13. Separación del lóbulo inferior diencefálico respecto al TO: 0) separado del TO; 1) en contacto con el TO; 2) superpuesto con el TO.

Carácter 14. Lobulación del lóbulo inferior diencefálico: 0) unilobular; 1) bilobular.

Carácter 15. Proyección anterior del hipotálamo: 0) poco proyectado, no sobresale del DIL por lo que lateralmente no se ve; 1) proyección intermedia, sobresale del DIL sin llegar a la línea divisoria entre TD y TO; 2) muy proyectado, sobresale del DIL alcanzando y/o superando la línea divisora entre el TD y TO.

Carácter 16. Morfología de la hipófisis desde ventral: 0) oblonga; 1) triangular; 2) bilobulada; 3) esférica.

Carácter 17. Posición de la hipófisis: 0) posición anterior, de la línea media del encéfalo proyectada hacia anterior; 1) posición posterior, de la línea media del encéfalo proyectada hacia posterior.

Carácter 18. Morfología del *corpus cerebelli* desde dorsal: 0) esférico; 2) triangular; 3) complejo.

Carácter 19. Definición del lóbulo caudal del *corpus cerebelli*: 0) ausente, no resuelto; 1) presente, se resuelve.

Carácter 20. Borde posterior del *corpus cerebelli* desde dorsal: 0) liso; 1) puntiagudo.

Carácter 21. Altura del *corpus cerebelli*: 0) deprimido, no sobresale del TO; 1) elevado por encima del TO.

Carácter 22. Definición de la *crista cerebelli*: 0) ausente, no resuelta; 1) presente, se resuelve.

Carácter 23. Borde dorsal de todo el encéfalo: 0) aplanado; 1) irregular.

### *Matriz de caracteres discretos cualitativos de la morfología encefálica*

---

En base a los caracteres discretos cualitativos de morfología encefálica propuestos anteriormente se construyó una matriz codificando los mismos para las especies en estudio.

**Tabla I.** Matriz de datos morfológicos designados para cada especie.

	Estructura	Forma y valor otorgado											
					A. cheradophilus	A. charrua	A. viarius	A. reicherti	A. arachan	A. prognathus	J. lineata	C. melanotaenia	
1	BO forma, vista ventral	Oval 0	Esférico 1			0	1	0	1	1	1	0	0
2	BO ventrículos, vista ventral	Sin ventrículo medial 0	Con ventrículo delantero 1	Ventrículo completo 2		2	0	0	0	0	2	0	2
3	BO forma, vista dorsal	No sobresale del TD 0	Sobresale del TD poco 1	Sobresale del TD mucho 2		1	1	2	2	1	2	0	0
4	TD forma, vista dorsal	Oblonga 0	Ovoidea 1	Semicircular 2	Con impresión lateral 3	1	3	3	3	2	1	0	2
5	TD ventrículo, vista dorsal	Sin ventrículo medial 0	Con abertura rostral 1	Con abertura caudal 2	Con abertura rostral y caudal 3	3	1	1	1	2	3	0	0
6	TV altura, vista lateral	Sin altura 0	Poca altura 1	Mucha altura 2		0	1	2	1	2	0	2	2
7	TV aspecto, vista ventral	Más fino que el BO 0	Igual que el BO 1	Más ancho que el BO 2		0	1	0	1	1	2	1	1
8	Órgano pineal	Poco desarrollo 0	Desarrollo intermedio 1	Gran desarrollo 2		2	0	0	0	1	2	2	2
9	NOp quiasma distal/proximal	Cruce proximal 0	Cruce distal 1			1	0	0	0	0	1	1	0
10	TO separación, vista dorsal	Sin separación 0	Con poca separación 1	Con mucha separación 2		1	1	1	1	1	2	0	0
11	TO forma, vista lateral	Oval 0	Esférico 1	Con ángulo posterodorsal 2		0	2	2	2	1	0	0	0
12	TO forma, vista dorsal	Oval 0	Complejo 1			0	0	0	0	0	0	1	0
13	DIL separación	Separado del TO 0	Poco metido en TO 1	Muy metido en TO 2		0	1	2	1	1	0	2	2
14	DIL lobulación (con o sin surcos)	Unilobular 0 (sin surcos)	Bilobular 1 (con surcos)			0	0	1	1	1	0	0	0
15	Hipotálamo proyección	Poco proyectado 0	Proyectado intermedio 1	Muy Proyectado 2		2	0	1	0	0	2	2	2
16	Hipófisis morfología	Oblonga 0	Triangular 1	bilobulada 2	Esférica 3	3	0	2	0	1	3	3	3
17	Hipófisis posición	Posición rostral 0	Posición caudal 1			0	1	1	1	1	0	0	0
18	Ccb forma	Esférico 0	Triangular 1	Complejo 2		0	0	1	0	0	0	2	0
19	Cerebelo, lóbulo caudal	Con LCa no resuelto 0	Con LCa resuelto 1			0	1	0	1	0	0	0	0
20	Ccb terminación caudal	Caudalmente liso 0	Caudalmente puntiagudo 1			0	0	0	0	0	0	1	0
21	Ccb altura	Aplastado 0	Elevado sobre el TO 1			1	1	1	1	1	1	0	0
22	Cerebelo estructura de CC	Con CC no resuelta 0	Con CC resuelta 1			1	1	1	1	1	1	0	1
23	Borde superior encefálico	Aplanado 0	Irregular 1			1	1	1	1	1	1	0	0

### *Matriz de caracteres de morfometría lineal del encéfalo*

Con las mediciones lineales que fueron tomadas como tales o que se utilizaron para hallar los volúmenes encefálicos se construyó una matriz morfométrica de datos con los promedios de las mediciones tanto para machos como para hembras. Estos datos se relativizan respecto al largo encefálico total, y cada uno fluctúa en un rango con un valor máximo y un valor mínimo. Esta matriz se muestra a continuación.

**Tabla II.** Matriz morfométrica de mediciones lineales\* de cada especie.

Especie	Largo TD	Alto TD	Ancho TD	Largo BO	Alto BO	Ancho BO	Largo DIL	Alto DIL	Ancho DIL									
<i>A. arachan</i>	0,28	0,34	0,23	0,27	0,23	0,27	0,13	0,17	0,12	0,16	0,14	0,16	0,29	0,35	0,12	0,16	0,20	0,24
<i>A. charrua</i>	0,31	0,37	0,26	0,30	0,25	0,27	0,15	0,17	0,14	0,16	0,12	0,16	0,26	0,32	0,14	0,18	0,21	0,23
<i>A. cheradophilus</i>	0,30	0,34	0,23	0,25	0,26	0,28	0,15	0,17	0,13	0,15	0,13	0,15	0,24	0,26	0,11	0,13	0,17	0,19
<i>A. prognathus</i>	0,26	0,30	0,21	0,23	0,24	0,24	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,21	0,27	0,10	0,12	0,18	0,18
<i>A. reicherti</i>	0,32	0,36	0,24	0,28	0,23	0,27	0,13	0,15	0,13	0,15	0,13	0,15	0,30	0,34	0,14	0,18	0,21	0,23
<i>A. viarius</i>	0,29	0,33	0,24	0,26	0,26	0,28	0,15	0,17	0,13	0,15	0,14	0,16	0,28	0,32	0,14	0,16	0,19	0,21
<i>C. melanotaenia</i>	0,34	0,40	0,21	0,23	0,25	0,29	0,13	0,17	0,12	0,14	0,11	0,13	0,33	0,37	0,12	0,16	0,24	0,26
<i>J. lineata</i>	0,31	0,37	0,26	0,30	0,25	0,27	0,15	0,17	0,14	0,16	0,12	0,16	0,26	0,32	0,14	0,18	0,21	0,23

Especie	Largo TO	Alto TO	Ancho TO	Largo Ccb	Alto Ccb	Ancho Ccb	Altura Enc 1	Altura Enc 2	Altura Enc 3	Ancho Enc 1										
<i>A. arachan</i>	0,41	0,43	0,33	0,37	0,34	0,38	0,28	0,30	0,13	0,25	0,31	0,35	0,28	0,32	0,49	0,53	0,24	0,30	0,44	0,50
<i>A. charrua</i>	0,36	0,40	0,32	0,36	0,32	0,36	0,25	0,27	0,16	0,22	0,25	0,29	0,31	0,33	0,49	0,53	0,22	0,24	0,43	0,47
<i>A. cheradophilus</i>	0,32	0,34	0,25	0,29	0,29	0,31	0,24	0,26	0,16	0,20	0,27	0,29	0,26	0,28	0,41	0,43	0,22	0,26	0,47	0,51
<i>A. prognathus</i>	0,35	0,37	0,28	0,30	0,28	0,30	0,24	0,28	0,18	0,18	0,25	0,29	0,18	0,26	0,41	0,43	0,17	0,17	0,40	0,46
<i>A. reicherti</i>	0,39	0,43	0,32	0,36	0,32	0,36	0,27	0,31	0,17	0,23	0,28	0,32	0,29	0,31	0,48	0,52	0,24	0,26	0,42	0,48
<i>A. viarius</i>	0,37	0,41	0,32	0,36	0,33	0,35	0,24	0,28	0,18	0,22	0,28	0,32	0,28	0,30	0,49	0,51	0,24	0,28	0,47	0,51
<i>C. melanotaenia</i>	0,45	0,49	0,34	0,38	0,37	0,41	0,29	0,31	0,15	0,21	0,29	0,33	0,26	0,30	0,50	0,54	0,24	0,28	0,44	0,50
<i>J. lineata</i>	0,36	0,40	0,32	0,36	0,32	0,36	0,25	0,27	0,16	0,22	0,25	0,29	0,31	0,33	0,49	0,53	0,22	0,24	0,43	0,47

Especie	Ancho Enc2	Ancho Enc 3	Ancho cerebelo	Ancho TLa	Ancho NOP	Ancho TV	Ancho HT	Ancho MO	Distancia DIL	Ancho NOIf										
<i>A. arachan</i>	0,71	0,77	0,26	0,28	0,45	0,51	0,50	0,54	0,07	0,09	0,24	0,28	0,27	0,33	0,31	0,35	0,01	0,03	0,03	0,03
<i>A. charrua</i>	0,70	0,74	0,24	0,26	0,44	0,48	0,45	0,49	0,07	0,09	0,21	0,23	0,25	0,29	0,24	0,26	0,01	0,05	0,04	0,04
<i>A. cheradophilus</i>	0,59	0,63	0,25	0,27	0,30	0,50	0,43	0,45	0,07	0,09	0,20	0,22	0,26	0,34	0,25	0,27	0,04	0,08	0,04	0,06
<i>A. prognathus</i>	0,58	0,60	0,21	0,23	0,40	0,44	0,34	0,42	0,08	0,10	0,20	0,22	0,23	0,27	0,22	0,24	0,04	0,04	0,05	0,05
<i>A. reicherti</i>	0,68	0,74	0,25	0,27	0,43	0,47	0,48	0,50	0,07	0,07	0,21	0,25	0,27	0,33	0,24	0,28	0,01	0,01	0,03	0,05
<i>A. viarius</i>	0,68	0,72	0,26	0,30	0,48	0,50	0,47	0,51	0,07	0,09	0,21	0,25	0,29	0,33	0,27	0,29	0,02	0,06	0,03	0,05
<i>C. melanotaenia</i>	0,78	0,84	0,27	0,29	0,45	0,49	0,49	0,55	0,08	0,10	0,22	0,24	0,29	0,33	0,26	0,30	0,01	0,03	0,03	0,03
<i>J. lineata</i>	0,70	0,74	0,24	0,26	0,44	0,48	0,45	0,49	0,07	0,09	0,21	0,23	0,25	0,29	0,24	0,26	0,01	0,05	0,04	0,04

\*Para cada estructura se muestra el valor mínimo (columna izquierda) y el valor máximo (columna derecha) del rango de valores relativizados según Goloboff et al. (2006).

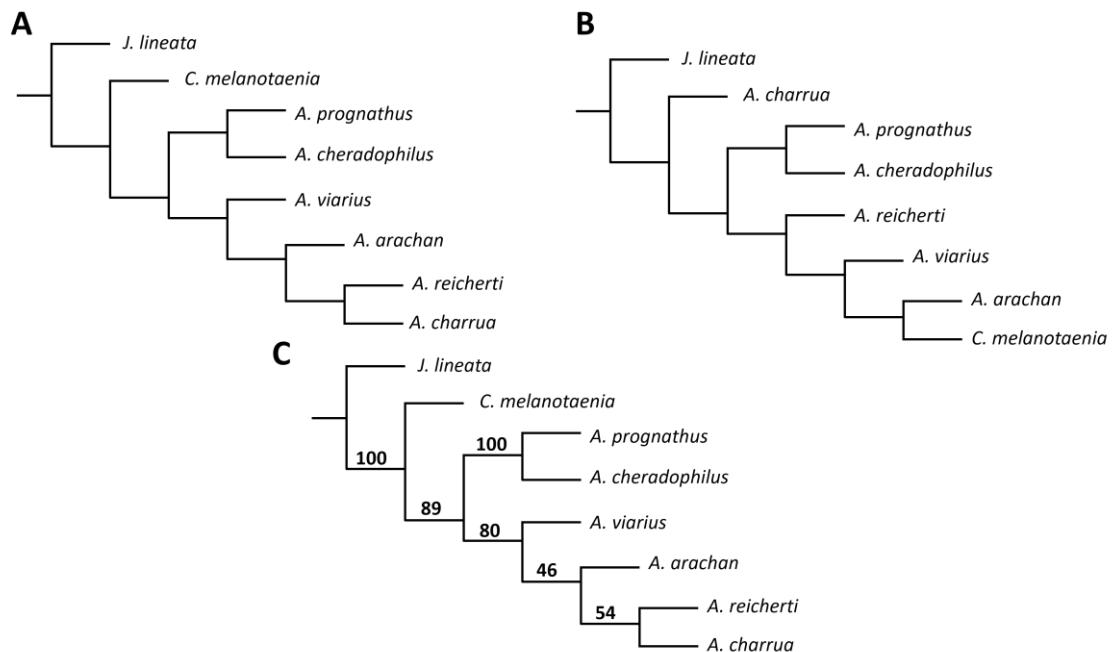
Finalmente, los datos morfométricos lineales (tabla III, caracteres del 0 al 28) y de volúmenes (tabla III, caracteres del 29 al 33) fueron integrados con los datos morfológicos (tabla III, caracteres del 34 al 56) en una **tabla común de caracteres** (Tabla III), adjudicándoles un número y luego se realizaron análisis filogenéticos y de sinapomorfías como indicadores de cambios evolutivos entre especies cercanas.

**Tabla III.** Caracteres morfológicos y morfométricos enumerados.

N° carácter	Carácter	N° carácter	Carácter	N° carácter	Carácter
0	Largo TD	19	Ancho Enc 2	38	TD ventrículo dorsal
1	Alto TD	20	Ancho Enc 3	39	TV altura Lateral
2	Ancho TD	21	Ancho Cerebelo	40	TV aspecto ventral
3	Largo BO	22	Ancho TLa	41	Órgano pineal
4	Alto BO	23	Ancho NOp	42	NOp quiasma distal/proximal
5	Ancho BO	24	Ancho TV	43	TO separación dorsal
6	Largo DIL	25	Ancho HT	44	TO forma lateral
7	Alto DIL	26	Ancho MO	45	TO forma dorsal
8	Ancho DIL	27	Distancia DIL	46	DIL separación
9	Largo TO	28	Ancho NOlf	47	DIL lobulación
10	Alto TO	29	Volumen TD	48	Hipotálamo proyección
11	Ancho TO	30	Volumen BO	49	Hipófisis morfología
12	Largo Ccb	31	Volumen DIL	50	Hipófisis posición
13	Alto Ccb	32	Volumen TO	51	Ccb forma
14	Ancho Ccb	33	Volumen Ccb	52	Ccb caudal
15	Altura Enc 1	34	BO forma ventral	53	Ccb terminación
16	Altura Enc 2	35	BO ventrículos ventral	54	Ccb altura
17	Altura Enc 3	36	BO forma dorsal	55	Cerebelo estructura de CC
18	Ancho Enc 1	37	TD forma dorsal	56	Borde superior encefálico

## Filogenia

Del análisis de los caracteres discretos del encéfalo bajo máxima parsimonia (MP) se obtuvo un árbol de un largo de 47 pasos (Fig. 33 A), en tanto que, con los caracteres continuos de morfometría lineal, se obtuvo un árbol de un largo de 30,57 (Fig. 33 B). Al analizar ambos grupos de datos en conjunto se obtuvo un único árbol final de un largo de 83.78 pasos (Fig. 33 C). El árbol basado en caracteres morfométricos muestra a *A. charrua* como grupo hermano del resto de los Rivulidae, quedando *C. melanotaenia* anidada en *Austrolebias* como especie hermana de *A. arachan*. En tanto los árboles obtenidos a partir de los caracteres cualitativos y la matriz integrada coinciden en segregar a *C. melanotaenia* como grupo hermano de las *Austrolebias* y dentro de *Austrolebias*, segrega por una parte al subgénero *Megalebias* y al subgénero *Acrolebias*. En el subgénero *Acrolebias*, hay discrepancias entre los 3 árboles, y postulamos como árbol de mayor relevancia al árbol de datos integrados por su riqueza global de datos. En cuanto a los valores GC (grupos presentes/contradichos) de soporte de los nodos del árbol de datos integrados, vemos que las principales ramas que segregan géneros y subgéneros presentan alto nivel de confianza del soporte (Fig. 33 C).



**Figura 33.** Árboles filogenéticos obtenidos a partir del análisis de datos morfológicos del encéfalo: A) basado en caracteres discretos cualitativos, B) basado en datos morfométricos lineales, y C) con ambos conjuntos de datos analizados en conjunto. Los valores sobre los nodos representan medidas de remuestreo simétricos de GC.

### *Sinapomorfías*

El análisis filogenético anterior, arrojó que 5 nodos presentaron sinapomorfías (Fig. 34 B), las que fueron:

1-Nodo 10: (carácter 6) largo del lóbulo inferior diencefálico; (9) largo del *tectum*; y (12) largo del *corpus cerebelli*.

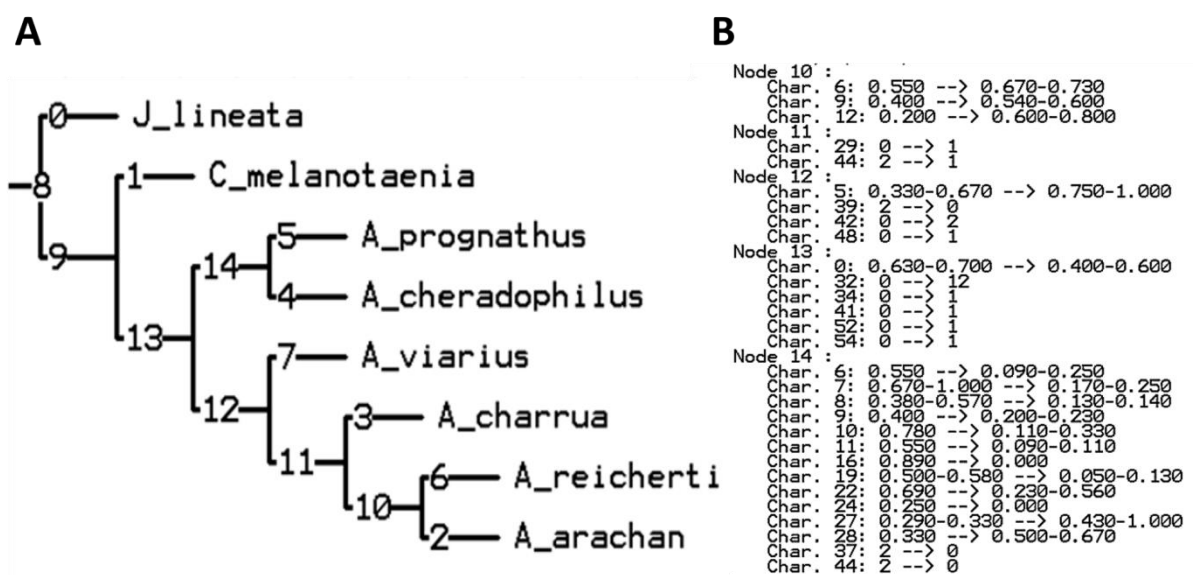
2-Nodo 11: (carácter 29) volumen del telencéfalo dorsal; y (44) morfología del *tectum*.

3-Nodo 12: (carácter 5) ancho del bulbo olfatorio; (39) morfología del telencéfalo ventral; (42) morfología del nervio óptico; y (48) morfología del hipotálamo.



4-Nodo 13: (carácter 0) largo del telencéfalo dorsal; (32) volumen del *tectum*; (34) morfología del bulbo olfatorio; (41) morfología del órgano pineal y (caracteres 52 y 54) morfología en el *corpus cerebelli*.

5-Nodo 14: (caracteres 6, 7 y 8) largo, ancho y altura del lóbulo inferior diencefálico; (9, 10, 11) largo, ancho y altura del *tectum*; (16, 19) altura y del ancho del encéfalo a nivel medio; (22) ancho entre los *tori laterales* contralaterales; (24) ancho del telencéfalo ventral; (27) distancia entre los hemisferios del lóbulo inferior diencefálico; (28) ancho del nervio olfativo; y (37, 44) morfología del telencéfalo dorsal y *tectum*.



**Figura 34.** En A se muestran las relaciones filogenéticas de las especies en estudio en base a la topología de Alonso *et al.*, 2023, basada en caracteres morfológicos y moleculares con los nodos analizados numerados. Los caracteres propuestos en el presente trabajo se optimizaron sobre esta topología y las sinapomorfías obtenidas se muestran en B.

### *Cambios evolutivos del encéfalo en las especies estudiadas*

Para analizar los cambios evolutivos a nivel de la anatomía gruesa del encéfalo en las especies analizadas, se optimizaron todos los caracteres propuestos y volúmenes encefálicos sobre una topología basada en Alonso *et al.* (2023).

En el nodo 10, antepasado común a *A. reicherti* y *A. arachan*, existen aumentos en el largo del lóbulo inferior diencefálico, en el largo del *tectum* y en el largo del *corpus cerebelli* (Fig. 34 A).

En el nodo 11, antepasado común de *A. charrua* y las especies *A. reicherti* y *A. arachan*, existe un aumento en el volumen del telencéfalo dorsal y un cambio significativo en la morfología del *tectum* (Fig. 34 A).

En el nodo 12, antepasado común de *A. viarius* y las especies *A. charrua*, *A. reicherti* y *A. arachan*, existe un aumento del ancho del bulbo olfatorio, un cambio significativo en la morfología del telencéfalo ventral, un cambio significativo en la morfología del nervio óptico, y un cambio en la morfología del hipotálamo (Fig. 34 A).

En el nodo 13, antepasado común de los subgéneros *Megalebias* y *Acrolebias*, existe una reducción en el largo del telencéfalo dorsal, un aumento en el volumen del *tectum*, un cambio en la morfología del bulbo olfatorio, un cambio en la morfología del órgano pineal y dos cambios morfológicos en el *corpus cerebelli* (Fig. 34 A).

Y, por último, en el nodo 14, antepasado común entre *A. prognathus* y *A. cheradophilus*, se registran varias disminuciones: del largo, ancho y altura del lóbulo inferior diencefálico y del *tectum*; de la altura y del ancho del encéfalo a nivel medio; del ancho entre los *tori laterales* contralaterales y en el ancho del telencéfalo ventral. Por otra parte, se registran dos aumentos: uno en la distancia entre los hemisferios del lóbulo inferior diencefálico y otro en el ancho del nervio olfativo, así como un cambio en la morfología del telencéfalo dorsal y *tectum* (Fig. 34 A).

## 4. Discusión

---

*Hay países pequeños; no hay naciones pequeñas. La verdad las engrandece y la verdad es un bien común. Esto patentiza el profundo sentido democrático de la investigación científica. Desventuradamente, millones de hombres ignoran las verdades de la Ciencia, a pesar de ser un bien común. Los bienes mayores del hombre son la salud y la cultura. La primera, como la libertad, se aprecia en todo su valor cuando se pierde; la segunda, por el contrario, sólo se aprecia bien cuando se posee.*

Clemente Estable (1894-1976)

### Integración morfológica y morfométrica del encéfalo de las especies estudiadas

---

Como aspectos metodológicos, considero que los métodos para la obtención y análisis de datos sobre la anatomía gruesa de los encéfalos fueron apropiados y puestos a punto. Esto, en el sentido de que el método utilizado no genera artefactos de técnica que se puedan traducir en retracciones de tejido, desgarros, pérdida de morfología o situación anatómica. Por otra parte, en la descripción morfológica, cabe aclarar que algunas estructuras se hacen más notorias a la visualización en un sexo que en el otro, o en unas especies más que en otras. Esto debido a la posición relativa de las estructuras entre sí y si dejan algún surco o accidente que facilite su visualización. Para establecer diferencias estructurales finas, se deberían realizar cortes histológicos y analizar su anatomía microscópica o histoarquitectura. En cuanto a la morfometría, el cálculo de volúmenes a partir de medidas lineales asemejando estructuras corporales/encefálicas a un elipsoide resultan buenos estimadores (Alonso, 2016; Watanabe y Kono, 2022).

Los encéfalos de los peces varían en morfología general y se componen de regiones que parecen parcialmente especializadas (Healy y Rowe, 2007) y el tamaño relativo de determinadas regiones del cerebro a menudo se asocia con condiciones ambientales que requieren determinadas tareas sensoriales o cognitivas (Jerison, 1973; Clutton-

Brock y Harvey, 1980; Kotrschal y Junger, 1988; Kotrschal y Palzenberger, 1992; van Staaden *et al.*, 1995).

Como se ha observado en otros teleósteos, en *Austrolebias* las correlaciones entre volumen encefálico y tamaño corporal son positivas, es decir que cuanto más crece el animal corporalmente, más crece el encéfalo. Como es característico en los poeciloterms, el crecimiento de los peces es indeterminado, en el sentido de que su tamaño corporal (largo y volumen) se incrementa a lo largo de su vida, aunque la tasa de crecimiento disminuye progresivamente (Helfman *et al.*, 2022). En este mismo sentido, se ha visto que a medida que aumenta el tamaño de la cabeza puede aumentar el tamaño del encéfalo (variable según la especie; Evans *et al.*, 2021). En *Austrolebias* hubo variaciones de carácter significativo de los volúmenes encefálicos relativos al volumen corporal, siendo las especies del subgénero *Megalebias* las que poseen un tamaño encefálico menor. Por otro lado, estas *Megalebias* tienen un porcentaje encefálico menor, es decir, si bien en el subgénero *Acrolebias* existe cierta relación en que a mayor tamaño corporal-mayor tamaño encefálico, en *Megalebias* se ve que de cierta forma ese crecimiento está limitado. Esto se puede corroborar en la disección de los encéfalos de *Megalebias*, donde se pueden apreciar espacios entre la masa encefálica y el cráneo, aunque no se constató la presencia de tejido adiposo linfático. A su vez, dentro de los grupos analizados, por ejemplo, entre *Megalebias* y *Acrolebias*, también se constataron variaciones morfológicas, aunque menos pronunciadas que las observadas entre las especies estudiadas dentro de esos subgéneros. Los encéfalos de las hembras de *Austrolebias*, muestran una tendencia a ser más grandes que los de los machos, pero no son significativas estadísticamente, lo que tal vez pueda comprobarse agrandando el n experimental para cada grupo. Además, se constataron diferentes estructuras sexualmente dimórficas, como la posición de los bulbos olfatorios, la morfología del telencéfalo dorsal y el *corpus cerebelli*, aunque no se constataron diferencias en los volúmenes. Además, el surco lateral del telencéfalo dorsal de *A. cheradophilus* hembra evidencia que más allá de ser estructuras variables externamente, posiblemente haya diferencias en la organización interna. Estas diferencias morfológicas entre especies son significativas taxonómica y sistemáticamente ya que, al analizar la matriz morfológica mediante los análisis

filogenéticos, recapitula otras filogenias arrojadas por análisis moleculares o de morfología externa y ósea (Costa, 2006, 2010; García *et al.*, 2014; Loureiro *et al.*, 2018). Si bien el telencéfalo (dorsal, ventral y bulbo olfatorio) de diferentes teleósteos varía notablemente, el patrón de organización general coincide con el descrito en otras especies (Northcutt, 2008). En *Austrolebias*, el bulbo olfatorio, que es el centro superior primario de la información olfativa, está bien desarrollado, teniendo un tamaño relativamente grande en comparación con otras estructuras encefálicas, sin llegar a ser una estructura exageradamente grande como en otros teleósteos como *Gymnothorax kidako*, donde es del mismo tamaño que los lóbulos telencefálicos (Ito *et al.*, 2007). En todas las especies analizadas, el bulbo olfatorio está adosado al resto de las estructuras encefálicas en lo que se denomina conformación sésil como lo descrito para otras especies (Mukuda y Ando, 2003; Meek y Nieuwenhuys, 1998; D'Angelo, 2013; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi *et al.*, 2016). Los lóbulos telencefálicos de *Austrolebias* presentan la estructura característica de los actinopterigios adultos, es decir con la conformación evertida del telencéfalo dorsal donde en teleósteos se observa un grado de eversión mayor que en los otros linajes (Nieuwenhuys, 2011). Estos lóbulos están implicados, sobre todo, en el comportamiento reproductivo, la alimentación, el aprendizaje y coordinación del nado (Kobayashi *et al.*, 2009), además de recibir e integrar la información olfativa (Schilling, 2002).

El diencefalo de *Austrolebias* presentó las estructuras y regiones características de los teleósteos (Ou y Yamamoto, 2016, Mukuda y Ando, 2003; Meek y Nieuwenhuys, 1998; D'Angelo, 2013; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi *et al.*, 2016; Arévalo *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2012; Cerdá-Reverter *et al.*, 2001), sin embargo, se encontraron algunas diferencias menores entre subgéneros, entre especies y entre sexos. Se vio que tanto la morfología de la hipófisis como del lóbulo inferior diencefálico (DIL), varían considerablemente. Si bien en este trabajo no se abordó la morfología y morfometría de la hipófisis, hemos de comentar que esta estructura presenta dos grandes divisiones que se manifiestan externamente por contraste en su coloración. Las variaciones del DIL y sus implicancias, así como el saco vasculoso, serán discutidas más adelante.

En cuanto al mesencéfalo, el *tectum* es el centro visual primario en todos los teleósteos y la estructura mesencefálica evidente desde la anatomía externa. En todas las especies estudiadas presentó la morfología característica de casquetes esferoides, con variaciones sutiles en morfología y diferentes tamaños relativos entre especies, las que tuvieron valor filogenético y sinapomórfico.

Algunos autores consideran que los términos metencéfalo y mielencéfalo, estrictamente se pueden utilizar únicamente en aves y mamíferos, donde hay una clara separación de ambas estructuras. Estos autores utilizan la denominación "rombencéfalo" para aludir conjuntamente a ambas estructuras en peces y es la nomenclatura utilizada en este trabajo (Wulliman, 1996; Karoubi, *et al.*, 2016). El cerebelo resultó ser la estructura más voluminosa en el rombencéfalo como se conoce para otros teleósteos. El *corpus cerebelli*, que está involucrado en el control motor (Tuge, 1934 a, b), presentó gran variación en morfología, si bien los volúmenes no variaron significativamente, a pesar de observarse una tendencia de mayor volumen en *Austrolebias*, lo que se podría corroborar estadísticamente aumentando el n de cada taxón. El lóbulo vagal que es centro gustatorio primario, en especies de *Megalebias* es de gran tamaño, siendo una estructura notoria en el dorso de la médula oblonga, sin presentar un desarrollo como en otros teleósteos (Ito *et al.*, 2007). En algunas especies se observó bien definido, como en *A. charrua* y *A. reicherti* pero en otras casi no se distingue, aunque esto se puede deber a la técnica utilizada para revelar estructuras con baño de azul de metileno. Probablemente con técnicas histológicas se pueda revelar si existen diferencias en esta estructura.

Los índices de variación morfológica resultaron una herramienta interesante para conocer cuáles son las estructuras que, en su volumen o sus medidas lineales, aportan a la variación que luego resultan en caracteres con valor filogenético y sistemático, informando cuáles estructuras son más plausibles de cambio (como ocurre con las sinapomorfías).

## Relación entre los cambios evolutivos en la anatomía del encéfalo con la ecología y el comportamiento de las especies estudiadas

---

Algunos autores consideran que el tamaño encefálico total y/o de sus partes se encuentra relacionado con la tasa metabólica basal (Hofman, 1983). Sin embargo, trabajos neuroecológicos realizados en teleósteos sugieren que el encéfalo puede presentar variaciones tanto de tamaño como de crecimiento, con relación a especializaciones sensoriales (van Staaden *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 1997; Wagner 2001a, b). En especies del subgénero *Megalebias*, el gran desarrollo del BO y del nervio olfativo, evidente morfológicamente, se constata desde la morfometría. Esta característica sumada al pequeño tamaño relativo del ojo respecto al cuerpo y cabeza (datos no trabajados en esta tesis) y el tamaño relativo menor del *tectum* (que se encarga, entre otros, del procesamiento visual de forma somatotópica (Meek y Nieuwenhuys, 1998), hace pensar que podría existir un predominio en la utilización de la olfacción respecto a la visión. La variación en la complejidad espacial y los requisitos de alimentación entre hábitats pueden imponer diferentes demandas cognitivas a los animales que pueden influir en el tamaño del cerebro (Axelrod *et al.*, 2018). Sin embargo, debido a que el mantenimiento del tejido neural es energéticamente costoso, un mayor tamaño del cerebro debe evolucionar y mantenerse solo bajo una fuerte selección de la capacidad cognitiva (Niven y Laughlin, 2008; Navarrete *et al.*, 2011; Kotrschal *et al.*, 2013). De esta manera, algunas variables ecológicas y comportamentales están relacionadas con variables en el tamaño y morfología del encéfalo. Entre éstas, se destacan las diferentes preferencias alimentarias de las especies dentro de un mismo hábitat, como ocurre entre *Acrolebias* y *Megalebias*. Las especies de *Acrolebias* son animales que se alimentan de zooplancton mientras que las de *Megalebias* son ictiófagas, son preferencias alimentarias dispares que podrían estar asociadas con la variación en el tamaño del encéfalo como se ha visto en otros clados (Axelrod *et al.*, 2018). Además, de este trabajo se desprende que las especies del subgénero *Megalebias* (nodo 14) presentan un aumento, significativo estructuralmente,

en el ancho del nervio olfativo, lo que revelaría la importancia de la olfacción como modalidad sensorial primordial de estas especies, que son predadores tope de sus ambientes. En otro taxa, se comprobó que tamaños más grandes del encéfalo se asocian con un mayor rendimiento predatorio (Axelrod *et al.*, 2022). Además, el olfato juega un rol fundamental para la reproducción, ecología y evolución de *Austrolebias* ya que, los ambientes en los que viven suelen volverse turbios y la visión casi imposibilitada, dando lugar al olfato como mecanismo sensorial predominante para la localización de presas y coespecíficos (Passos *et al.*, 2013a). Esto se evidencia en al menos tres aspectos: (1) Los machos emiten señales químicas perceptibles al olfato de las hembras que generan claves para el comportamiento reproductivo (Passos *et al.*, 2013b); (2) la elección de la pareja homoespecífica favorece el aislamiento reproductivo (Passos *et al.*, 2013a); y (3) las hembras pueden distinguir a los machos de su especie utilizando el olfato (Reyes *et al.*, 2018). Además, en *Austrolebias* existe plasticidad en regiones específicas del encéfalo en función de las condiciones ambientales. En un ambiente oscuro, la neurogénesis adulta en el BO predomina frente a la del TO, mientras que en un ambiente luminoso el TO presenta mayor tasa neurogénica que el BO (Berrosteguieta, 2020). Esto nos hace pensar que más allá del tamaño de las estructuras neurales, existen otros factores que juegan un papel importante en la *performance* sensorial, como el repertorio de pistas químicas del ambiente.

Por otro lado, en *Megalebias* el lóbulo inferior diencefálico es más pequeño que en *Acrolebias*. Esta, es una estructura que no está presente en los tetrápodos, que probablemente haya evolucionado específicamente en un determinado grupo de Actinopterygii que contiene teleósteos y holósteos (incluidos Lepisosteidae). Esta estructura posee origen hipotalámico y, recientemente, Bloch *et al.* (2019), utilizando técnicas de seguimiento de linaje celular, han adjudicado un origen mixto diencefálico y mesencefálico. Se le han adjudicado diversas funciones multisensoriales, donde destacan los datos de Muto *et al.* (2017) que sugieren la participación del DIL en la detección visual (presas/objetos en movimiento). Estos datos podrían estar relacionados con lo encontrado respecto a la disminución de estructuras visuales primarias (ojo, *tectum*) y los múltiples roles del olfato en estas especies. En los análisis de sinapomorfías se constata una disminución evolutiva del DIL, traducido desde dos



variables: 1- disminución en el ancho entre los *tori laterales* contralaterales, es decir menor ancho global de las estructuras diencefálicas posthipotalámicas (DIL); y 2- aumento en la distancia entre los hemisferios del lóbulo inferior diencefálico, es decir un afinamiento de cada hemisferio del DIL.

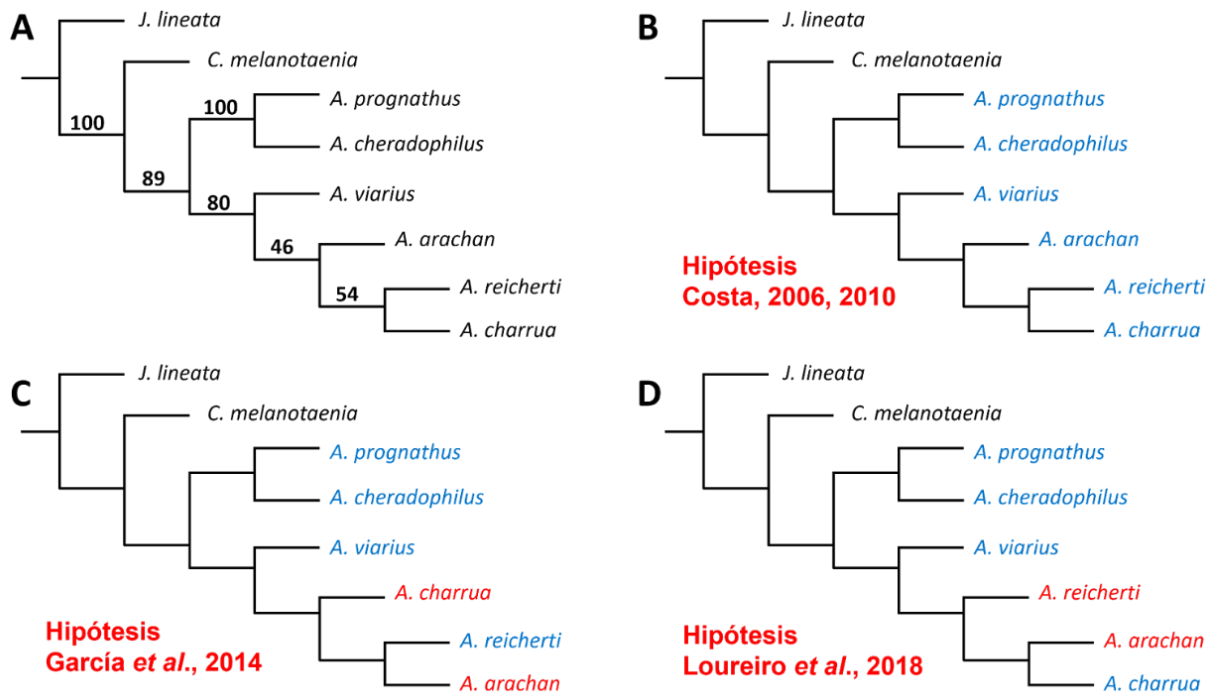
A nivel diencefálico ventro-posterior, existe una estructura que se presenta en los peces y algunos anfibios, que es el *saccus vasculosus*. Este saco se forma en el piso del diencefalo como un receso derivado del infundíbulo y que cumple algunas funciones importantes tales como registrar la presión de la columna de agua en el punto donde está situado el animal, así como también detectar el fotoperíodo a lo largo de las estaciones climáticas. Se ha descrito que este saco tiene una estructura y tamaño variables, siendo muy grande en peces de agua salada, de tamaño mediano en peces de río y muy reducido o ausente en peces de pequeños cuerpos de agua continentales y charcos (van de Kamer y Schuurmans, 1953). En las especies aquí estudiadas, no se ha podido evidenciar la existencia del *saccus vasculosus* ni de algún primordio, aunque en esa zona se encontraron grandes vasos con pigmentación. Estos datos corresponden con lo descrito para peces que habitan charcos (van de Kamer y Schuurmans, 1953) o pequeños cuerpos de agua (*J. lineata*). Asimismo, en otros teleósteos cuyos hábitats naturales son cuerpos de agua mayores, tampoco se ha encontrado esta estructura, como es el caso de *Danio rerio* (Wullimann *et al.*, 1996), revelando la importancia de su estudio fino y más en detalle desde el punto de vista histológico, morfológico y funcional.

La reducción de ciertas estructuras (p. ej. DIL) o la completa desaparición (p. ej. *saccus vasculosus*), podría ser significativa en términos de la hipótesis del tejido costoso, ya que el mantenimiento y desarrollo ontogenético de estructuras encefálicas con poco aporte al fitness biológico, serían sustrato para una selección negativa (Niven y Laughlin, 2008; Navarrete *et al.*, 2011; Kotrschal *et al.*, 2013). Por el contrario, el aumento de ciertas estructuras (p. ej. bulbo olfatorio, nervio olfativo) podrían explicar muchas de las características sensoriales, ecológicas y conductuales, que desempeñan un papel clave en su evolución.

## Filogenia obtenida a partir de datos morfológicos y morfométricos encefálicos

---

La filogenia de los peces anuales sudamericanos ha estado en constante revisión y cambio y actualmente se ha completado la revisión de estas taxa (Alonso *et al.*, 2023). Algunas filogenias para *Austrolebias* se han propuesto en base a datos moleculares, otras en base a datos morfológicos y otras de forma mixta. Entre ellas se han resuelto grandes clados de forma consensuada, habiendo discrepancias a nivel unidades taxonómicas menores. En este trabajo utilizamos datos morfológicos y morfométricos encefálicos de algunas especies de *Austrolebias* y dos grupos externos (*C. melanotaenia* y *J. lineata*) para obtener un árbol filogenético exclusivo para estos caracteres. El árbol obtenido presentó topología concordante con los demás árboles antes presentados por otros autores (Costa, 2006 y 2010; García *et al.*, 2014; Loureiro *et al.*, 2018), lo que nos permitió plantear nuestra hipótesis filogenética con gran soporte (Fig. 35 A). Con respecto a las hipótesis de Costa, 2006 y 2010, que postulan filogenias en base a caracteres morfológicos (fenotipo externo y óseos) obtuvimos un árbol que recapitula toda su topología (Fig. 35 B). Con respecto a la hipótesis de García *et al.*, 2014, que postula una filogenia en base a caracteres moleculares, vemos un gran solapamiento topológico. Nuestro árbol posiciona a *A. charrua* como especie más emparentada con *A. reicherti* formando un grupo hermano con *A. arachan*, mientras que García *et al.*, 2014 postulan a *A. reicherti* más estrechamente emparentada con *A. arachan* y éstas dos como grupo hermano de *A. charrua* (Fig. 35 C). La hipótesis de Loureiro *et al.*, 2018, que fue propuesta en base a caracteres morfológicos y moleculares, postula a *A. arachan* más estrechamente emparentada con *A. charrua*, y estas dos como grupo hermano de *A. reicherti* (Fig. 35 C). Es decir, con las hipótesis de García *et al.*, 2014 y Loureiro *et al.*, 2018, hay discrepancias de un solo cambio a nivel de especies terminales, respecto a nuestra hipótesis. Este hecho permite ver la relevancia de los caracteres morfológicos y morfométricos encefálicos que, más allá de contextualizar en especializaciones funcionales, estilos de vida y ecología, aportan datos valiosos para reconstruir la historia evolutiva de las especies de teleósteos, estando éstas aún muy emparentadas.



**Figura 37.** Hipótesis filogenéticas de las especies estudiadas en este trabajo. En A, la hipótesis gestada en esta tesis, a partir de datos encefálicos. En B, la hipótesis de Costa 2006 y 2010, en base a caracteres morfológicos. En C, la hipótesis de García *et al.* (2014) en base a datos moleculares. En D, la hipótesis de Loureiro *et al.* (2018) en base a caracteres morfológicos y datos moleculares.

## 5. Conclusiones

---

*Quien pretende conocer una ciencia no debe limitarse a reconocer frutos maduros, sino que ha de procurar investigar dónde y cómo se ha desarrollado.*

Santiago Ramón Cajal (1852-1934).

A partir del análisis morfológico, morfométrico y filogenético obtenido en este trabajo, podemos concluir que:

1- Si bien la morfología general del encéfalo de las especies estudiadas presentó los patrones estructurales típicos de los teleósteos sensorialmente generalistas, existe relativa variabilidad interespecífica y dimorfismo sexual en algunas estructuras encefálicas.

2- A nivel morfológico existen diferencias en diversas estructuras encefálicas que presentan valor filogenético y evolutivo, siendo algunas de ellas caracteres sinapomórficos.

3- A nivel morfométrico existen diversas estructuras cuyo tamaño relativo es diferente según la especie, pero no existen dimorfismos sexuales.

4- En todas las especies analizadas (Cyprinodontiformes) se constató que a nivel macroscópico no existe el *saccus vasculosus*.

5- La hipótesis filogenética obtenida recupera las agrupaciones y relaciones previamente propuestas por otros autores, sobre todo coincidiendo a grandes rasgos con las hipótesis filogenéticas propuestas por Costa en 2006 y 2010.

6- Los caracteres morfológicos y morfométricos encefálicos, más allá de contextualizar en especializaciones funcionales, estilos de vida y ecología, aportan datos valiosos para reconstruir la historia evolutiva de las especies de teleósteos, estando éstas aún muy emparentadas.

*Every man gets a narrower and narrower field of knowledge in which he must be an expert in order to compete with other people. The specialist knows more and more about less and less and finally knows everything about nothing.*

Konrad Lorenz (1903-1989)

## Trabajos relacionados a la presente tesis

---

- Presentación oral en el VI Congreso Uruguayo de Zoología, trabajo titulado: Evolución del encéfalo en un grupo paradigmático de peces estacionales del género *Austrolebias* (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE). Diciembre de 2021.
- Presentación oral en el Ciclo de Seminarios de Biología de Peces, Facultad de Ciencias, UdelaR, trabajo titulado: Evolución en peces teleósteos: un aporte de la anatomía del encéfalo del killifish. Noviembre de 2021.
- Serra W., Scarabino F., Torres-Pérez M., Furtado G. (2021). First record of the critically endangered killifish *Austrolebias univentripinnis* Costa & Cheffe, 2005 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) for Uruguay. HISTORIA NATURAL. Tercera Serie Volumen 11 (3) 19-29.

## 6. Referencias

---

1. Abrahão, V. P., Pupo, F. M., & Shibatta, O. A. (2018). Comparative brain gross morphology of the Neotropical catfish family Pseudopimelodidae (Osteichthyes, Ostariophysi, Siluriformes), with phylogenetic implications. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 184(3), 750–772. <https://doi.org/10.1093/zoolinlean/zly011>
2. Alonso, F. (2016). Integrando anatomía y comportamiento de la familia Characidae (Teleostei: Ostariophysi) en un contexto filogenético. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Último acceso: 19/09/2023. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6265\\_Alonso](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6265_Alonso)
3. Alonso, F., & Calviño, P. (2018). The viviparous killifish and the history of the application of the word killifish (Cyprinodontiformes). *BIBKCA*, 21, 55-65. Último acceso: 19/09/2023. <http://www.aik.it/wp-content/uploads/2018/02/BIBKCA-21.pdf>
4. Alonso, F., Calviño, P. A., Terán, G. E., & García, I. (2016). Geographical distribution of *Austrolebias monstrosus* (Huber, 1995), *A. elongatus* (Steindachner, 1881) and *A. vandenbergi* (Huber, 1995) (Teleostei: Cyprinodontiformes), with comments on the biogeography and ecology of Rivulidae in Pampasic and Chaco floodplains. *Check List*, 12(4), 1-7. <https://doi.org/10.15560/12.4.1945>
5. Alonso, F., Terán, G. E., Aguilera, G., Řičan, O., Casciotta, J., Serra, W. S., Almirón, A., Benítez, M. F., García, I., & Mirande, J. M. (2019).

Description of a new species of the Neotropical cichlid genus

*Gymnogeophagus* Miranda Ribeiro, 1918 (Teleostei: Cichliformes) from the Middle Paraná basin, Misiones, Argentina. PLoS ONE, 14(2), e0210166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210166>

6. Alonso, F., Terán, G. E., Serra Alanís, W. S., Calviño, P., Montes, M. M., García, I. D., Barneche, J. A., Almirón A., Ciotek L. Giorgis P. & Casciotta, J. (2023). From the mud to the tree: Phylogeny of *Austrolebias* killifishes, new generic structure and description of a new species (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 20, 1–30. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlad032>
7. Arévalo, R., Alonso, J. R., Brion, J. G., & García-Ojeda, E. (1992). An atlas of the brain of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Cyprinidae, Teleostei). Journal für Hirnforschung, 33(4-5), 487-497.
8. Axelrod, C. J., Laberge, F., & Robinson, B. W. (2018). Intraspecific brain size variation between coexisting sunfish ecotypes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 285(1890), 20181971. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1971>
9. Axelrod, C. J., Robinson, B. W., & Laberge, F. (2022). Evolutionary divergence in phenotypic plasticity shapes brain size variation between coexisting sunfish ecotypes. Journal of Evolutionary Biology, 35(10), 1363–1377. <https://doi.org/10.1111/jeb.14085>
10. Berois, N., Arezo, M. J., Papa, N. G., & Clivio, G. A. (2012). Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. Wiley



Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 1(4), 595–602.

<https://doi.org/10.1002/wdev.39>

11. Berrostequieta Rodríguez, I. (2020). Estudio de la neuroplasticidad en peces del género *Austrolebias* frente a cambios en la luminosidad. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias - PEDECIBA. Universidad de la República. Último acceso: 19/09/2023.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/29529?mode=full>
12. Birse, S. C., Leonard, R. B., & Coggeshall, R. E. (1980). Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *Lebistes*. *The Journal of Comparative Neurology*, 194(2), 291–301.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901940202>
13. Bloch, S., Thomas, M., Colin, I., Galant, S., Machado, E., Affaticati, P., Jenett, A., & Yamamoto, K. (2019). Mesencephalic origin of the inferior lobe in zebrafish. *BMC Biology*, 17(1), 1-16.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0631-y>
14. Brandstätter, R., & Kotrschal, K. (1989). Life history of roach, *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain, Behavior and Evolution*, 34(1), 35-42. <https://doi.org/10.1159/000116489>
15. Brandstätter, R., & Kotrschal, K. (1990). Brain growth patterns in four European cyprinid fish species (Cyprinidae, Teleostei): Roach (*Rutilus rutilus*), Bream (*Abramis brama*), Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Sabre Carp (*Pelecus cultratus*). *Brain, Behavior and Evolution*, 35(4), 195–211. <https://doi.org/10.1159/000115867>

16. Cerdá-Reverter, J. M., Zanuy, S., & Muñoz-Cueto, J. A. (2001).  
Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass  
(*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *Journal of Morphology*,  
247(3), 217-228. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200103\)247:3<217::AID-JMOR1013>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103)247:3<217::AID-JMOR1013>3.0.CO;2-U)
17. Clutton-Brock, T. H., & Harvey, P. H. (1980). Primates, brains and  
ecology. *Journal of Zoology*, 190(3), 309-323.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01430.x>
18. Costa, W. J. E. M. (2006). The South American annual killifish genus  
*Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): Phylogenetic  
relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*,  
1213(1), 1-162. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1213.1.1>
19. Costa, W. J. E. M. (2008). Catalog of Aplocheiloid killifishes of the  
world. *Reproarte*, Rio de Janeiro, 127p.
20. Costa, W. J. E. M. (2010). Historical biogeography of cynolebiasine  
annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. *Journal of  
Biogeography*, 37(10), 1995–2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02339.x>
21. D'Angelo, L. (2013). Brain atlas of an emerging teleostean model:  
*Nothobranchius furzeri*. *The Anatomical Record*, 296(4), 681-691.  
<https://doi.org/10.1002/ar.22668>
22. Datovo, A., & Vari, R. P. (2014). The adductor mandibulae muscle  
complex in lower teleostean fishes (Osteichthyes: Actinopterygii):  
Comparative anatomy, synonymy, and phylogenetic implications.

Zoological Journal of the Linnean Society, 171(3), 554-622.

<https://doi.org/10.1111/zoj.12142>

23. Eifert, C., Farnworth, M., Schulz-Mirbach, T., Riesch, R., Bierbach, D., Klaus, S., Wurster A., Tobler M., Streit B., Indy J. R., Arias-Rodríguez L. & Plath, M. (2015). Brain size variation in extremophile fish: Local adaptation versus phenotypic plasticity. *Journal of Zoology*, 295(2), 143-153. <https://doi.org/10.1111/jzo.12190>
24. Evans, H. M. (1931). A comparative study of the brains in British cyprinoids in relation to their habits of feeding, with special reference to the anatomy of the *medulla oblongata*. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 108(757), 233-257.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1931.0035>
25. Evans, K. M., Larouche, O., Watson, S. J., Farina, S., Habegger, M. L., & Friedman, M. (2021). Integration drives rapid phenotypic evolution in flatfishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(18), e2101330118.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2101330118>
26. Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., & Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study. *Neuroscience*, 189, 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.063>
27. Fricke R., Eschmeyer W. N. & van der Laan R. (2023). Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. Institute for Biodiversity Science and Sustainability – California Academy of Sciences. Último acceso: 19/09/2023.

[https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp?\\_gl=1\\*10isezj\\*\\_ga\\*NjQ4MDUxMTg3LjE2OTUxNjQ3MTg.\\*\\_ga\\_6Y72VP61VZ\\*MTY5NjExOTUxOS4yLjAuMTY5NjExOTUyOC41MS4wLjA](https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp?_gl=1*10isezj*_ga*NjQ4MDUxMTg3LjE2OTUxNjQ3MTg.*_ga_6Y72VP61VZ*MTY5NjExOTUxOS4yLjAuMTY5NjExOTUyOC41MS4wLjA).

28. García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B., Santiñaque, F., López-Carro, B., & Folle, G. (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1), 87–98.  
<https://doi.org/10.1007/s10709-014-9756-7>
29. Gebhardt, I. C., & Hofmann, M. H. (2023). The Diversity of the Brains of Ray-Finned Fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 98(4), 171–182.  
<https://doi.org/10.1159/000530243>
30. Ghezelayagh, A., Harrington, R. C., Burress, E. D., Campbell, M. A., Buckner, J. C., Chakrabarty, P., Glass, J. R., McCraney, W. T., Unmack, P. J., Thacker, C. E., Alfaro, M. E., Friedman, S. T., Ludt, W. B., Cowman, P. F., Friedman, M., Price, S. A., Dornburg, A., Faircloth, B. C., Wainwright, P. C., & Near, T. J. (2022). Prolonged morphological expansion of spiny-rayed fishes following the end-Cretaceous. *Nature Ecology & Evolution*, 6(8), 1211-1220. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01801-3>
31. Goloboff P., Farris J. S., Källersjö M., Oxelman B., Ramírez M.J. & Szumik C. A. (2003). Improvements to resampling measures of group support. *Cladistics*, 19(4), 324–332.  
[https://doi.org/10.1016/s0748-3007\(03\)00060-4](https://doi.org/10.1016/s0748-3007(03)00060-4)

32. Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5), 774–786.  
<https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>
33. Goloboff, P. A., Mattoni, C. I., & Quinteros, A. S. (2006). Continuous characters analyzed as such. *Cladistics*, 22(6), 589–601.  
<https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2006.00122.x>
34. Healy, S. D., & Rowe, C. (2007). A critique of comparative studies of brain size. *Proceedings of the Royal Society, B*, 274(1609), 453–464.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3748>
35. Heldstab, S. A., Isler, K., Graber, S. M., Schuppli, C., & van Schaik, C. P. (2022). The economics of brain size evolution in vertebrates. *Current Biology*, 32(12), R697–R708. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.096>
36. Helfman G, Collete B., & Facety D. (2022). *The diversity of fishes: Biology, evolution, and ecology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 720p.
37. Hennig, W. (1965). Phylogenetic systematics. *Annual Review of Entomology*, 10(1), 97-116.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.10.010165.000525>
38. Herrick, C. J. (1902). The organ and sense of taste in fishes. *Bulletin of United States Fish Commission*, 22, 237-272.
39. Herrick, C. J. (1906). On the centers of taste and touch in the *medulla oblongata* in fishes. *The Journal of Comparative Neurology and Psychology*. 16(6), 403-439. <https://doi.org/10.1002/cne.920160603>
40. Hofman, M. A. (1983). Evolution of brain size in neonatal and adult placental mammals: A theoretical approach. *Journal of Theoretical*

Biology, 105(2), 317-332.

[https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(83\)80011-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(83)80011-3)

41. Huber, R., van Staaden, M. J., Kaufman, L. S., & Liem, K. F. (1997). Microhabitat use, trophic patterns, and the evolution of brain structure in African cichlids. *Brain, Behavior and Evolution*, 50(3), 167-182.  
<https://doi.org/10.1159/000113330>
42. Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Ito, H. (1999). A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal Medaka*, 10, 1-26. <https://doi.org/10.18999/FISBJM.10.1>
43. Ito, H., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Yamamoto, N. (2007). Diversity of brain morphology in teleosts: Brain and ecological niche. *Brain, Behavior and Evolution*, 69(2), 76-86.  
<https://doi.org/10.1159/000095196>
44. Jerison, H. J. (1973). *Evolution of the Brain and Intelligence*. Academic Press, New York. 482p.
45. Karoubi, N., Segev, R., & Wullimann, M. F. (2016). The brain of the archerfish *Toxotes chatareus*: A nissl-based neuroanatomical atlas and catecholaminergic/cholinergic systems. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(106), 1-20. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00106>
46. Kobayashi, N., Yoshida, M., Matsumoto, N., & Uematsu, K. (2009). Artificial control of swimming in goldfish by brain stimulation: Confirmation of the midbrain nuclei as the swimming center. *Neuroscience Letters*, 452(1), 42-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.035>

47. Kotrschal, A., Rogell, B., Bundsen, A., Svensson, B., Zajitschek, S., Brännström, I., Immler, S., Maklakov, A. A., & Kolm, N. (2013). Artificial selection on relative brain size in the guppy reveals costs and benefits of evolving a larger brain. *Current Biology*, 23(2), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.058>
48. Kotrschal, K., & Junger, H. (1988). Patterns of brain morphology in mid-European Cyprinidae (Pisces, Teleostei): A quantitative histological study. *Journal für Hirnforschung*, 29(3), 341-352. Último acceso: 19/09/2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3418119/>
49. Kotrschal, K., & Palzenberger, M. (1992). Neuroecology of cyprinids: Comparative, quantitative histology reveals diverse brain patterns. *Environmental Biology of Fishes*, 33, 135–152. <https://doi.org/10.1007/BF00002560>
50. Kotrschal, K., van Staaden, M. J., & Huber, R. (1998). Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8, 373-408. <https://doi.org/10.1023/A:1008839605380>
51. Lanés, L. E. K., Volcan, M. V., & Maltchik, L. (2021). Two new annual fishes (Cyprinodontiformes: Rivulidae) unexpectedly discovered in the highlands of southern Brazil. *Zootaxa*, 4949(3), 12-28. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4949.3.4>
52. Leonard, R. B., Coggeshall, R. E., & Willis, W. D. (1978). A documentation of an age-related increase in neuronal and axonal numbers in the stingray, *Dasyatis sabina*, Leseuer. *The Journal of Comparative Neurology*, 179(1), 13-21. <https://doi.org/10.1002/cne.901790103>

53. Lopes, S. A., Grant, K., & Hoffmann, A. (1998). Afferent and efferent connections of the dorsocentral telencephalon in an electrosensory teleost, *Gymnotus carapo*. *Brain, Behavior and Evolution*, 52(2), 81-98. <https://doi.org/10.1159/000006554>
54. Loureiro, M., de Sá, R., Serra, S. W., Alonso, F., Lanés, L. E. K., Volcan, M. V., Calviño, P., Nielsen, D., Duarte, A., & Garcia, G. (2018). Review of the family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus *Austrolebias* Costa 1998. *Neotropical Ichthyology*, 16(3), e180007 [20pp.]. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180007>
55. Mayr, E. (1982). *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*. University Press, London, 992p.
56. Meek, J., & Nieuwenhuys, R. (1998). Holosteans and teleosts. In: *The central nervous system of vertebrates*, Vol. 2. Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J., & Nicholson, C., (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 759–938.
57. Mirande, J. M. (2017). Combined phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) and the use of morphological characters in large-scale analyses. *Cladistics*, 33(4), 333–350. <https://doi.org/10.1111/cla.12171>
58. Mukuda, T., & Ando, M. (2003). Brain atlas of the Japanese eel: Comparison to other fishes. *Memoirs of the Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University IV, Science Reports*, 29, 1-25.
59. Muñoz-Cueto, J. A., Sarasquete, C., Zohar, A. H., Kah, O. (2001). *An Atlas of the Brain of the Gilthead Seabream (Sparus aurata)*. Maryland Sea Grant College, Maryland, 126p.



60. Muto, A., Lal, P., Ailani, D., Abe, G., Itoh, M., & Kawakami, K. (2017). Activation of the hypothalamic feeding centre upon visual prey detection. *Nature Communications*, 8, 15029 [10pp].  
<https://doi.org/10.1038/ncomms15029>
61. Navarrete, A., Van Schaik, C. P., & Isler, K. (2011). Energetics and the evolution of human brain size. *Nature*, 480(7375), 91–93.  
<https://doi.org/10.1038/nature10629>
62. Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. John Wiley and Sons, Hoboken-New Jersey, 601p.
63. Nieuwenhuys, R. (2011). The development and general morphology of the telencephalon of actinopterygian fishes: Synopsis, documentation and commentary. *Brain Structure & Function*, 215(3-4), 141–157.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-010-0285-6>
64. Niven, J. E., & Laughlin, S. B. (2008). Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology*, 211(11), 1792–1804. <https://doi.org/10.1242/jeb.017574>
65. Northcutt, R. G. (2008). Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Research Bulletin*, 75(2-4), 191-205.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.058>
66. Ou, R., & Yamamoto, N. (2016). Forebrain atlas of Japanese jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Ichthyological Research*, 63(3), 405-426.  
<https://doi.org/10.1007/s10228-016-0509-8>
67. Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G. G., & González, A. (2013b). Female annual killifish *Austrolebias reicherti*

- (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*, 119(10), 891–897. <https://doi.org/10.1111/eth.12129>
68. Passos, C., Tassinio, B., Loureiro, M., & Rosenthal, G. G. (2013a). Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes*, 96, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.01.008>
69. Reyes, F., Tassinio, B., & Passos, C. (2018). Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. *Behavioural Processes*, 155, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.08.007>
70. Rosa, A. C., Martins, F. de O., & Langeani, F. (2021). Gross brain morphology of Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae): Comparative anatomy and phylogenetic implications. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(1), 111–147. <https://doi.org/10.1111/jzs.12424>
71. Schilling, F. (2002). The morphology of larval and adult zebrafish. In: *Zebrafish*. Nüsslein-Volhard, C., & Dahm, R. (eds). Oxford University Press, Oxford, pp. 59-94.
72. Simões, J. M., Teles, M. C., Oliveira, R. F., Van der Linden, A., Verhoye, M. (2012). A three-dimensional stereotaxic MRI brain atlas of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *PLoS ONE* 7(9), e44086 [8 pp.]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044086>

73. Sukhum, K. V., Shen, J., & Carlson, B. A. (2018). Extreme enlargement of the cerebellum in a clade of teleost fishes that evolved a novel active sensory system. *Current Biology*, 28(23), 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.038>
74. Tobias, J. A., Cornwallis, C. K., Derryberry, E. P., Claramunt, S., Brumfield, R. T., & Seddon, N. (2014). Species coexistence and the dynamics of phenotypic evolution in adaptive radiation. *Nature*, 506(7488), 359–363. <https://doi.org/10.1038/nature12874>
75. Tuge, H. (1934b). Studies on cerebellar function in the teleost. I. Reactions resulting from cerebellar ablation. *Journal of Comparative Neurology*, 60(2), 201-224. <https://doi.org/10.1002/cne.900600203>
76. Tuge, H. (1934a). Studies on cerebellar function in the teleost. II. Is there a cerebello-tectal path? Marchi method. *Journal of Comparative Neurology*, 60(2), 225-236. <https://doi.org/10.1002/cne.900600204>
77. van de Kamer, J. C., & Schuurmans, A. J. (1953). Development and structure of the *saccus vasculosus* of *Scylliorhinus caniculus* (L.). *Development*, 1(1), 85-96.
78. van Staaden, M., Huber, R., Kaufman, S., y Liem, F. (1995). Brain evolution in Cichlids of the African Great Lakes: Brain and body size, general patterns, and evolutionary trends. *Zoology*, 98(3), 165-178.
79. Volcan, M. V., Barbosa, C., Robe, L. J., Lanés, L. E. K. (2021). Molecular phylogeny of the *Austrolebias/ adloffii/* group (Cyprinodontiformes, Rivulidae), with description of two new endangered and highly endemic species of annual killifishes from the Laguna dos Patos system, southern Brazil. *Zootaxa*, 4965(1), 87-113.

80. Wagner, H. J. (2001b). Sensory brain areas in mesopelagic fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 57(3), 117-133.  
<https://doi.org/10.1159/000047231>
81. Wagner, H. J. (2001a). Brain areas in abyssal demersal fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 57(6), 301-316.  
<https://doi.org/10.1159/000047249>
82. Watanabe, S., & Kono, M. (2022). Comparative study of Japanese eel and yellowfin goby brains using a new brain size index. *Fisheries Science*, 88(6), 733–740.  
<https://doi.org/10.1007/s12562-022-01635-9>
83. Wcislo, W. T. (2021). A dual role for behavior in evolution and shaping organismal selective environments. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 52, 343-362.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-012921-052523>
84. Wullimann, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (1996). The brain of the zebrafish *Danio rerio*: A neuroanatomical atlas. In: *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. Wullimann, M.F., Rupp, B., Reichert, H., (eds). Birkhäuser, Basel, pp. 19-87.