

## Notas breves de investigación

### Análisis morfométrico de espermatozoides de peces nativos de lagunas pampásicas

### Morphometric analysis of spermatozoa from native fish of pampean shallow lake

SCHULMAN, MARÍA EMILIA<sup>1</sup> , CARTELLE, JONATHAN HERNÁN<sup>1,2</sup> , MALCERVELLI, DANIELA MARINA<sup>1,2</sup> ,  
TORRES, PABLO<sup>1,2,3</sup> , RIVOLTA, MIGUEL ÁNGEL<sup>1,2</sup> , CISALE HUMBERTO OSVALDO<sup>1,2</sup> , FISCHMAN,  
MARÍA LAURA<sup>1,2</sup> .

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Física Biológica.  
Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología  
en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Producción de Porcinos.  
Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [jcartelle@fvvet.uba.ar](mailto:jcartelle@fvvet.uba.ar)

**RESUMEN.** Las lagunas pampásicas proveen hábitats para especies de peces con importancia biológica, económica y social. En la región Sudamericana, muchas de las especies comerciales están sobreexplotadas. Esto impulsó la implementación de criaderos para mantener la demanda de la producción acuícola. La utilización de biotecnologías reproductivas, como la criopreservación de semen, permitiría aumentar la producción de los criaderos. Para ello, se debe tener en cuenta que el manejo de semen criopreservado requiere herramientas adecuadas que permitan evaluar su capacidad fecundante. En la actualidad, la morfometría de los espermatozoides de peces no se incluye en las evaluaciones de rutina. Este parámetro, junto con la movilidad, viabilidad, concentración, morfología e integridad de membrana, son determinantes de la calidad del semen. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros morfométricos de las células espermáticas de especies nativas pampásicas *Oligosarcus jenynsii*, *Odonthestes bonariensis* y *Cyphocharax voga* mediante la utilización de un sistema computarizado para el análisis de semen. Estas determinaciones permitieron obtener parámetros de referencia en relación con el tamaño y la forma celular. Se observaron diferencias interespecíficas significativas en los parámetros relacionados con el tamaño de los espermatozoides, mientras que la forma de las cabezas espermáticas de las tres especies analizadas tendió a ser esférica. Este trabajo constituye un aporte en el análisis de la morfometría de espermatozoides de peces de especies autóctonas.

**Palabras clave:** Autóctonos, espermatozoides, morfometría, peces

**ABSTRACT.** The pampean shallow lakes provide habitat for fish species with biological, economic, and social importance. In the South American region, many commercial species are overexploited. This boosted the implementation of hatcheries to maintain the demand for aquaculture production. The use of reproductive biotechnologies, such as cryopreservation of semen, would increase the production of hatcheries. To do this, it should be considered that the management of cryopreserved semen requires adequate tools to evaluate its fertility. Up to the present, morphometry of fish sperm is not included in routine assessments. This parameter, along with mobility, viability, concentration, morphology and membrane integrity, are determinants of semen quality. The aim of this study was

to evaluate the morphometric parameters of sperm cells in pampean native species *Oligosarcus jenynsii*, *Odonthestes bonariensis* and *Cyphocharax voga* using a computerized system for semen analysis. These determinations allowed obtaining reference parameters in relation to the cell size and shape. Significant interspecific differences were observed in sperm size parameters, while the shape of the sperm heads of the analyzed species tended to be spherical. This work constitutes a contribution in the analysis of the morphometry of fish sperm of native species.

**Keywords:** Fish, morphometry, native, sperm

## INTRODUCCIÓN

Las lagunas pampásicas conforman el hábitat de especies de peces con importancia biológica, económica y social. Gracias a este recurso ictícola, en la zona se destacan distintas actividades de pesca comercial, de subsistencia y deportivo-recreativas (Iwaszkiw & Firpo Lacoste, 2011).

En los países de la región se observa un continuo crecimiento de captura (FAO, 2022), motivo por el cual muchas de las especies se encuentran sobreexplotadas. Estas problemáticas requerirían una aproximación ecosistémica para su adecuado manejo (Scarabotti *et al.*, 2021).

Como respuesta a la sobreexplotación y a una creciente demanda productiva, se observa un mayor desarrollo de recursos ictícolas a través de la implementación de criaderos (Cappato *et al.*, 2010).

Las especies utilizadas en el presente estudio, dientudo *Oligosarcus jenynsii* (Günther, 1864), pejerrey *Odonthestes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes, 1835) y sabalito *Cyphocharax voga* (Hensel, 1870), son representantes del producto local y forman parte de la alimentación de especies de mayor valor comercial (Velasco *et al.*, 2008).

La implementación de biotecnologías de la reproducción en especies acuícolas criadas en cautiverio incrementó la capacidad de producción de especies de importancia económica (Díaz y Neira, 2005). Una de las biotecnologías más empleada en estas especies es la criopreservación de semen, la cual es esencial en los programas de mejoramiento animal (Medina-Robles *et al.*, 2019).

El manejo de semen criopreservado para la reproducción artificial en los criaderos requiere la obtención de gametos de buena calidad. Para

tal fin se necesitan herramientas adecuadas, rápidas y sensibles para evaluar la capacidad fecundante del semen (Rurangwaa *et al.*, 2003). Existen diversos parámetros que influyen sobre ésta y forman parte del análisis de rutina: movilidad, viabilidad, concentración, integridad de membranas y morfología (López-Hernández *et al.*, 2018).

Actualmente, debido a la escasa información acerca de los parámetros morfométricos normales en las especies autóctonas, el análisis morfométrico no se incluye en la evaluación de la calidad seminal de rutina, a pesar de que algunos indican su potencial relevancia para obtener buenos resultados al momento de la fecundación de los oocitos (Miliorini *et al.*, 2010). Por este motivo, el registro de los parámetros morfométricos es importante a la hora de optimizar los protocolos de conservación de gametos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros morfométricos de las células espermáticas de *O. jenynsii*, *O. bonariensis* y *C. voga* mediante la utilización de un sistema computarizado para el análisis de semen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de muestras

Los ejemplares de los cuales se recolectó semen fueron obtenidos en campañas de pesca realizadas en la provincia de Buenos Aires en las lagunas pampásicas: Monasterio (35°46'59.2"S, 57°52'27.2"W), La Tablilla (35°46'55.7"S, 58°01'18.8"W) y Chis Chis (35°46'14.0"S, 57°58'24.4"W). Las campañas fueron realizadas en verano, durante el mes de enero, considerando que la época reproductiva

se concentra entre los meses de agosto hasta marzo, dependiendo de la especie: agosto - noviembre en pejerrey (*O. bonariensis*), septiembre - marzo en sabalito (*C. voga*) y octubre - enero en dientudo (*O. jenynsii*). Se obtuvieron muestras de semen de cuatro ejemplares de dientudo (*O. jenynsii*) obtenidos con líneas y anzuelos, seis ejemplares de pejerrey (*O. bonariensis*) obtenidos con líneas y anzuelos y doce ejemplares de sabalito (*C. voga*) obtenidos con trasmallo. Los rangos de tallas de los ejemplares obtenidos fueron: 13,6 cm a 18,7 cm para dientudo (*O. jenynsii*), 28,3 cm a 36,1 cm para pejerrey (*O. bonariensis*) y 15,8 cm a 19,4 cm para sabalito (*C. voga*). En todos los casos se trabajó con ejemplares maduros sexualmente. Al capturar los ejemplares se los colocó en posición dorso-ventral, se limpió el vientre y se realizaron movimientos de presión leve en sentido cráneo-caudal. El semen fue recolectado con pipetas. Las muestras fueron transportadas en solución salina 3% (m/v) refrigeradas a 4°C, luego fueron conservadas en heladera a la misma temperatura hasta su procesamiento. El tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y la realización de los frotis fue de 24 h.

### Preparación histológica

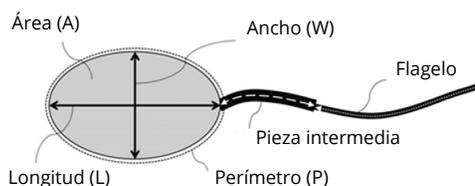
Se realizaron extendidos con 10  $\mu$ l de muestra sobre portaobjetos, dejándolos secar a temperatura ambiente durante 1 h. Se utilizó el kit de tinción diferencial rápido (Tinción 15®, BIOPUR, Argentina), compuesto por tres soluciones: 1) Solución fijadora alcohólica metanol, 2) Solución colorante ácida (solución xanténica, roja) y 3) Solución colorante básica (solución tiazínica, azul). Los extendidos se sumergieron durante 5 segundos en cada solución. Por último, se realizó un lavado con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente durante 24 h (BIOPUR, 2019).

### Análisis morfométrico de las muestras

El análisis morfométrico de las muestras se realizó en el módulo de morfometría del CASA

(Computer Assisted Sperm Analysis, Isas® Proiser versión 1.2), con objetivo de inmersión (100X). El tamaño del marco de captura de fotogramas de video fue de 768x576x8 bits y 256 niveles de gris. La resolución de las imágenes fue de 0,08  $\mu$ m por píxel en los ejes horizontal y vertical. Se capturaron al azar no menos de 150 espermatozoides por muestra, sin presentar superposiciones entre los mismos.

El tamaño de la cabeza espermática se evaluó a través de la determinación de los siguientes parámetros directos: longitud (L, en  $\mu$ m), ancho (W, en  $\mu$ m), área (A, en  $\mu$ m<sup>2</sup>) y perímetro (P, en  $\mu$ m). A partir de estos valores se obtuvieron parámetros indirectos, más representativos de la forma de la cabeza: elipticidad ( $L / W$ ), rugosidad ( $4\pi A / P^2$ ), elongación ( $(L \cdot W) / (L + W)$ ) y regularidad ( $\pi L W / 4A$ ) (Tuset *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Parámetros directos obtenidos. Figura adaptada de Cursino y Duarte (2016).

**Figure 1.** Direct parameters obtained. Figure adapted from Cursino & Duarte (2016).

### Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como medias  $\pm$  desvíos estándares. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk modificada para determinar si las variables presentaban distribución normal. Para evaluar la existencia de espermatozoides con diferentes características morfométricas se realizó el análisis de conglomerados, según el método de agrupamiento no jerárquico K-means con medidas de distancia Euclídea. Para determinar diferencias en los distintos parámetros morfométricos entre los conglomerados, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis. El nivel de significación utilizado fue del 5%. Se utilizó el software InfoStat® versión 2018p.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espermatozoides se observaron de una tonalidad violeta bien definida, mostrando contraste e intensidad de coloración adecuada, con un fondo limpio, que permitió su detección y evaluación mediante el CASA. Las colas no mostraron la misma intensidad de coloración, por lo que la mayoría de ellas no se llegaron a observar.

De cada muestra se realizaron tres frotis, en cada uno de los cuales se analizaron al menos 150 espermatozoides. Se detectaron las cabezas espermáticas de forma individual y se obtuvieron los parámetros de cada una. Las células con posibles defectos de tinción no se tuvieron en cuenta para el análisis. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tinción 15®. Media  $\pm$  desvío estándar de los parámetros morfométricos de espermatozoides de sabalito, dientudo y pejerrey.

**Table 1.** Tinción 15®. Mean  $\pm$  standard deviation of morphometric parameters of sabalito, dientudo and pejerrey spermatozoa.

Parámetros de cabeza/Especie	Dientudo (n=250)	Pejerrey (n=179)	Sabalito (n=200)
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	2,84 $\pm$ 0,24	2,92 $\pm$ 0,26	2,61 $\pm$ 0,29
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	2,68 $\pm$ 0,25	2,79 $\pm$ 0,26	2,42 $\pm$ 0,24
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	9,15 $\pm$ 0,78	9,43 $\pm$ 0,85	8,33 $\pm$ 0,86
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	6,23 $\pm$ 1,07	6,65 $\pm$ 1,2	5,18 $\pm$ 1,16
Elipticidad	1,06 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,04
Elongación	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,03

Para las muestras analizadas, las variables en estudio no presentaron distribución normal ( $p < 0,05$ ).

Para determinar las diferencias existentes entre los parámetros morfométricos tomando la totalidad de espermatozoides evaluada para cada especie, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvieron diferencias significativas en la longitud, ancho, perímetro y área en todas las especies ( $p < 0,05$ ).

Se conformaron 3 conglomerados de espermatozoides (A, B, C) para cada especie.

Para determinar diferencias en la longitud, el ancho, el perímetro y el área entre los conglomerados se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Distribución de espermatozoides según conglomerado: dientudo A=120, B=75, C=55; pejerrey A = 81, B = 46, C = 52; sabalito A = 196, B = 2, C = 2

En el dientudo se observaron diferencias significativas entre los conglomerados para los parámetros longitud y ancho ( $p < 0,05$ ). El conglomerado que presenta mayor tamaño espermático es el C.

En el pejerrey se observaron diferencias significativas entre los conglomerados para el ancho ( $p < 0,05$ ). Con respecto a la longitud, el perímetro y área, se observaron diferencias en el conglomerado B ( $p < 0,05$ ), el que mostró los espermatozoides de mayor tamaño.

En el sabalito se observaron diferencias significativas en el conglomerado A para los parámetros longitud, ancho, perímetro y área ( $p < 0,05$ ), siendo este conglomerado el que presentó los espermatozoides más pequeños. Para determinar las diferencias existentes entre los parámetros morfométricos en el conglomerado que presenta mayor cantidad de espermatozoides según especie, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvieron diferencias significativas en la longitud, ancho, perímetro y área en todas las especies ( $p < 0,05$ ) (Ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Medias y desvíos estándar de los parámetros longitud, ancho, perímetro y área del conglomerado con mayor cantidad de espermatozoides según especie. Letras distintas indican diferencias significativas en una misma medida analizada ( $p < 0,05$ ).

**Table 2.** Means and standard deviations of the parameter length, width, perimeter, and area of the cluster with the highest number of sperm according to species. Different letters indicate significant differences in the same analyzed measurement ( $p < 0.05$ ).

Parámetro/Especie	Pejerrey (n=81)		
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	2,64 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,77 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	2,58 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	2,59 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,73 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	2,41 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	5,61 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	6,17 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	5,09 $\pm$ 0,84 <sup>c</sup>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	8,79 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	9,09 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	8,26 $\pm$ 0,69 <sup>c</sup>

El estudio de la morfometría del espermatozoide de los peces es una práctica que está tomando relevancia en el campo de la producción acuícola y que puede, eventualmente, proporcionar mayores herramientas al momento de evaluar la calidad seminal.

Algunos autores (Langen *et al.*, 2019) describen que puede existir una correlación positiva entre la longitud del espermatozoide (considerando cabeza y cola) y la capacidad fecundante.

Actualmente las evaluaciones seminales de rutina en peces incluyen el tiempo durante el cual los espermatozoides están activos, las características del movimiento espermático, el porcentaje de células móviles, la concentración espermática e integridad de la membrana plasmática (López-Hernández *et al.*, 2018).

En el presente estudio se estudiaron las valoraciones morfométricas de los espermatozoides de peces nativos de las lagunas pampásicas que actualmente no se incluyen en las evaluaciones seminales de rutina y pueden contribuir a la rúbrica de datos existente para cada especie.

Para la evaluación morfométrica mediante sistema CASA, las cabezas de los espermatozoides se colorearon con buena intensidad de color permitiendo un contraste adecuado que permitió la captura de imágenes durante el análisis.

Al analizar con el CASA los frotis teñidos con T15®, se obtuvieron los parámetros morfométricos directos, pudiendo determinarse valores del tamaño celular que pueden tomarse como referencia para la comparación en futuros estudios.

Es necesario considerar que, para determinar el tamaño espermático normal de cada especie o la posible existencia de subpoblaciones espermáticas normales, se debería evaluar un mayor número de espermatozoides en diferentes etapas del año y con diferentes estadios reproductivos.

En el presente estudio, se consideraron 3 conglomerados para cada especie que podrían indicar la existencia de subpoblaciones. Asimismo, se evaluaron las diferencias existentes entre los parámetros que indican tamaño celular. Se obtuvo para el pejerrey

y dientudo, un conglomerado de mayor cantidad de espermatozoides formado por aproximadamente el 50% de la población, y los otros conglomerados, aproximadamente el 25-30% cada uno. Sin embargo, para el sabalito, se encontró un conglomerado formado por el 98% de los espermatozoides analizados.

También podrían observarse diferencias en los valores morfométricos evaluados dependiendo de la técnica de procesado y tinción utilizada. Este efecto se podría deber a una mayor o menor deshidratación de las muestras analizadas, a las variaciones geográficas y/o a divergencias taxonómicas (Gregorin *et al.*, 2019). En todas las especies se encontró un conglomerado que presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los parámetros evaluados, el cual estaba conformado por los espermatozoides de mayor tamaño en el pejerrey y el dientudo. En el sabalito fue el conglomerado de menor tamaño, pero de un número de espermatozoides considerablemente mayor y representativo.

El parámetro menos conservado entre los conglomerados de cada especie fue el ancho, ya que presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). A diferencia del anterior, el perímetro y en consecuencia el área, variaron juntos en todas las muestras evaluadas.

Al analizar las diferencias existentes en los parámetros de tamaño celular entre las especies, sin considerar los conglomerados, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la longitud, ancho, área y perímetro. Lo mismo ocurrió al analizar las diferencias existentes entre los conglomerados de mayor número espermático para cada especie, no hubo ningún parámetro conservado.

La forma celular fue determinada gracias a los parámetros denominados indirectos o derivados. Se observó en todas las especies que los espermatozoides presentaron una elipticidad cercana a 1 y una elongación cercana a 0, lo que indicó que la forma de las cabezas espermáticas de las muestras analizadas tiende a ser esférica. Cabe aclarar, que la rugosidad y regularidad, ambas con un valor cercano a 1 en estas especies, no fueron parámetros significativos, debido a la forma esférica.

Para determinar la morfología normal de un espermatozoide es importante tener en cuenta el momento del ciclo reproductivo en que se toma la muestra, y la maduración sexual de los ejemplares (Felizardo *et al.*, 2016). En estas especies, los espermatozoides se obtuvieron hacia el final de la época reproductiva, por lo que algunos de sus espermatozoides podrían clasificarse como anormales. Por ejemplo, el conglomerado de mayor número espermático ("A" en todas las muestras analizadas) podría haber sido considerado como tamaño estándar en estos individuos, teniendo en cuenta que para determinar el tamaño normal de una especie se requiere analizar un mayor número de espermatozoides de los analizados en este trabajo. En cuanto a los conglomerados B y C de sabalito, se los podría haber considerado como espermatozoides defectuosos, ya que fueron 4 células que se distinguieron en un total de 200 células espermáticas. En cuanto al resto de los conglomerados, habría que evaluar un mayor número de espermatozoides para poder afirmar que se trata de subpoblaciones presentes de manera consistente en el año reproductivo de la especie.

Estos supuestos podrían servir como iniciadores para el estudio del tamaño estándar de los espermatozoides de especies autóctonas de peces y para determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas.

## CONCLUSIONES

La demanda creciente de la producción y comercialización de ciertas especies ictícolas, sumado al impacto socio-ambiental de la sobreextracción de especies autóctonas hacen pertinente el desarrollo de la acuicultura para lo cual la evaluación de la calidad seminal de las especies es clave.

A pesar de que el estudio de los parámetros morfométricos de los espermatozoides se puede ver influenciado tanto por el sistema CASA utilizado como por el procesamiento de las muestras, en especies en las que no se cuenta con abundante información, los parámetros pueden ser tomados como referencia para su comparación y evaluación.

Las medidas preliminares de forma y tamaño espermático en estas especies pueden servir para integrar al análisis de calidad seminal y, como ya se mencionó, es de vital importancia que los espermatozoides presenten adecuada morfología y morfometría para lograr una correcta fecundación del oocito, junto con otros parámetros de importancia (movilidad, viabilidad, concentración espermática, e integridad de membrana) (López-Hernández *et al.*, 2018). Este trabajo constituye un aporte en el análisis de la morfometría de espermatozoides de peces de especies autóctonas.

## REFERENCIAS

- BIOPUR. (2019).** BIOPUR *Diagnostics. Tinción* 15. Obtenido de [http://www.biopur.com.ar/tincion\\_15.html](http://www.biopur.com.ar/tincion_15.html)
- Cappato, J. V. (2010).** *Conservación de los peces de la Cuenca del Plata en Argentina: enfoques metodológicos para su evaluación y manejo.* Buenos Aires: Fundación Humedales / Wetlands International.
- Cursino, M. S. & Duarte, J. M. (2016).** Using sperm morphometry and multivariate analysis to differentiate species of gray Mazama. *Royal Society Open Science*, 3(11), 1-9
- Díaz, N. F., & Neira, R. (2005).** Biotecnología aplicada a la Acuicultura. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 45-59.
- FAO. (29 de Septiembre de 2022).** *El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA).* Roma, Italia; 288: FAO.
- Felizardo, V. O., Nonato Mourad, N. M., Vieira Melo, C. C., Reis, P. S., Solis Murgas, L. D., & Fonseca De Freitas, R. T. (2016).** Influential Factors of Quality of Fish Gametes for Use of In Vitro Fertilization. *Journal of Fertilization: In Vitro*, 4, 166.

- Gregorin, E. G., Felizardo, V. O., Melo, C. V., Freitas, R. T., Souza, U. N., & Costa, A. C. (2019).** Qualitative semen parameters and comparative morphology of pirapitinga, pacu and tambaqui sperm. *Boletim de Indústria Animal*, 76, 18.
- Iwaszkiw, J. M., & Firpo Lacoste, F. (2011).** La pesca artesanal en la Cuenca del Plata (Argentina) y sus implicancias en la conservación de la biodiversidad. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 13(1), 21-25.
- Langen, K., Thünken, T., Klemm, J., Sandmann, S., & Bakker, T. C. (2019).** Sperm size is negatively related to relative testis size in West African riverine cichlid fishes. *Naturwissenschaften*, 106 (30), 5-6.
- López-Hernández, J. C., Osorio-Pérez, A., Jiménez-Félix, S. A., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G. S., & Arias-Rodríguez, L. (2018).** La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 10, 1.
- López-Hernández, J., Osorio-Pérez, A., Jiménez-Félix, S., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G., & Arias-Rodríguez, L. (2018).** Review article: Fish sperm quality and assessment methods. *Journal of Marine and Coastal Sciences*, 10(1), 67-96.
- Medina-Robles, V. M., Guaje-Ramírez, D. N., Marin-Cossio, L. C., Sandoval-Vargas, L. Y., & Cruz-Casallas, P. E. (2019).** Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. *Orinoquia*, 23(1), 15-24.
- Miliorini, A., Solis-Murgas, L., Rosa, P., Oberlender, G., Machado, G., & Costa, D. (2010).** A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, 42, 177 - 187.
- Scarabotti, P. A., Lucifora, L. O., Espínola, L. A., Rabuffetti, A. P., Liotta, J., Mantinian, J. E., Sánchez, S. (2021).** Long-term trends of fishery landings and target fish populations in the lower La Plata basin. *Neotropical Ichthyology*, 19(3), 1-31.
- Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Słowińska, M., de Monserrat, J., & Ciereszko, A. (2008).** Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 69(8), 1033-1038.
- Velasco, C. A., Berasain, G. E., & Ohashi, M. (2008).** Producción intensiva de juveniles de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Biología Acuática*, 24, 53-58.