



Comparación citogenética del cariotipo de progenies de cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*) obtenidas con semen fresco y crioconservado

Cytogenetic comparison of the white Cachama progeny karyotype (*Piaractus orinoquensis*) obtained with fresh and cryopreserved semen

Comparaçãocitogenética do cariótipo da progênie de Cachama branca (*Piaractus orinoquensis*) obtida com sêmen fresco e criopreservado

Paula Andrea Páez-Sánchez^{1*}, Santiago José Bustamante-Morales²,
Esteban David Güiza-Rozo³, Diana Nathalie Guaje-Ramírez⁴, Owens José Barros-Barrios⁵,
Sandro Tonello⁶, Víctor Mauricio Medina-Robles⁷

***Autor de correspondencia:** papaez@unillanos.edu.co

Recibido: 10 de febrero de 2026 **Aceptado:** 19 de febrero de 2026

Resumen

La citogenética facilita el análisis de la integridad cromosómica para identificar alteraciones potenciales derivadas del empleo de biotecnologías reproductivas, como el uso de semen crioconservado en la producción de peces nativos y de importancia económica como *Piaractus orinoquensis*, especie distinguida de sus parientes mediante métodos genéticos y morfológicos. La demanda de técnicas que faciliten la reproducción artificial en periodos no estacionales impulsó el desarrollo de la crioconservación de semen, técnica que amplía la accesibilidad a gametos durante todo el año y ayuda a mitigar las restricciones del manejo reproductivo ligado a ciclos estacionales en esta especie oriunda de la Orinoquía colombiana. El objetivo consistió en comparar los cariotipos de progenies de cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*) fertilizadas con semen fresco versus crioconservado, evaluando diferencias en calidad genética y cromosómica entre ambas estrategias reproductivas. Este estudio utilizó el protocolo

- 1 Est. MVZ. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1378-536X>
- 2 Est. MVZ. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6388-7673>
- 3 MVZ. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2158-2764>
- 4 MVZ, MSc. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6519-6372>
- 5 MVZ, MSc. Grupo de Investigación Sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8900-7062>
- 6 Biólogo, MSc, PhD(c). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva PPG-GCBEV, Amazonas, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7213-8717>
- 7 MVZ, MSc, Dr. Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos-GRITOX, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Instituto de Acuicultura y Pesca de los Llanos, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4871-2715>

La Revista Sistemas de Producción Agroecológicos es una revista de acceso abierto revisada por pares. © 2012. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Internacional Creative Commons Attribution 4.0 (CC-BY 4.0), que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor y la fuente originales.

Consulte <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

OPEN ACCESS



Como citar este artículo / How to cite this article: Páez-Sánchez, P. A., Bustamante-Morales S. J., Güiza-Rozo, E. D., Guaje-Ramírez, D. N., Barros-Barrios, O. J., Tonello, S., Medina-Robles, V. M. (2026). Comparación citogenética del cariotipo de progenies de cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*) obtenidas con semen fresco y crioconservado. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 17(1), e-1434. DOI: <https://doi.org/10.22579/22484817.1434>

de Bertollo et al. (1978), aplicando métodos de recolección, fijación y examen cromosómico en células renales. Se analizaron cromosomas de crías generadas con semen fresco y crioconservado, detectando 27 pares cromosómicos sin cambios morfológicos significativos entre grupos. Los hallazgos confirman que la crioconservación mantiene la estabilidad genética en condiciones óptimas, respaldando su aplicación en esquemas de reproducción controlada, preservación genética y cultivo estacional, favoreciendo la sostenibilidad de especies nativas acuícolas.

Palabras clave: Biotecnologías; cariotipos; citogenética; cromosomas.

Abstract

Cytogenetics facilitates the analysis of chromosomal integrity to identify potential alterations derived from the use of reproductive biotechnologies, such as cryopreserved semen in the production of native fish of economic importance as *Piaractus orinoquensis*, a species distinguished from its relatives through genetic and morphological methods. The demand for techniques that facilitate artificial reproduction in non-seasonal periods drove the development of semen cryopreservation, a technique that expands gamete accessibility throughout the year and helps mitigate the restrictions of reproductive management linked to seasonal cycles in this species native to the Colombian Orinoquia. The objective was to compare the karyotypes of progenies of cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*) fertilized with fresh versus cryopreserved semen, evaluating differences in genetic and chromosomal quality between both reproductive strategies. This study applied the protocol of Bertollo et al. (1978), with methods of collection, fixation, and chromosomal examination in renal cells. Chromosomes from offspring generated with fresh and cryopreserved semen were analyzed, revealing 27 chromosomal pairs without significant morphological changes between groups. The findings confirm that cryopreservation maintains genetic stability under optimal conditions, supporting its application in controlled reproduction schemes, genetic preservation, and seasonal farming, favoring the sustainability of native aquaculture species.

Keywords: Biotechnologies; karyotypes; cytogenetics; chromosomes.

Resumo

A citogenética facilita a análise da integridade cromossômica para identificar alterações potenciais derivadas do emprego de biotecnologias reprodutivas, como o uso de sêmen crioconservado na produção de peixes nativos e de importância econômica como *Piaractus orinoquensis*, espécie distinta de seus parentes mediante métodos genéticos e morfológicos. A demanda de técnicas que facilitem a reprodução artificial em períodos não estacionais impulsionou o desenvolvimento da crioconservação de sêmen, técnica que amplia a acessibilidade a gametas durante todo o ano e ajuda a mitigar as restrições do manejo reprodutivo ligado a ciclos estacionais nesta espécie oriunda da Orinoquia Colombiana. O objetivo consistiu em comparar os cariótipos de progênies de cachama branca (*Piaractus orinoquensis*) fertilizadas com sêmen fresco e compará-las com as geradas a partir de sêmen crioconservado, avaliando diferenças em qualidade genética e cromossômica entre ambas as estratégias reprodutivas. Este estudo utilizou o protocolo de Bertollo et al. (1978), aplicando métodos de coleta, fixação

e exame cromossômico em células renais. Foram analisados cromossomos de proles geradas com sêmen fresco e criopreservado, detectando 27 pares cromossômicos sem mudanças morfológicas significativas entre grupos. Os achados confirmam que a criopreservação mantém a estabilidade genética em condições ótimas, respaldando sua aplicação em esquemas de reprodução controlada, preservação genética e cultivo estacional; favorecendo a sustentabilidade de espécies nativas aquícolas.

Palavras-chave: Biotecnologias; cariótipos; citogenética; cromossomos.

Introducción

La cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*), nombre común con el que se conoce a esta especie, se distribuye en la cuenca del Orinoco y fue diferenciada en 2019 de *P. brachypomus* (Cuvier, 1818), especie propia de la cuenca amazónica, mediante el análisis de caracteres morfológicos y el uso de marcadores nucleares y mitocondriales (Escobar et al., 2019). Análisis moleculares posteriores confirman la clara delimitación entre ambas especies con respecto a su distribución geográfica, demostrando que *P. orinoquensis* no presenta estructuración poblacional (Escobar et al., 2022). La cachama blanca es ampliamente cultivada por acuicultores del departamento del Meta (Colombia), lo que convierte a *P. orinoquensis* en una especie de importancia tanto ecológica como económica.

La citogenética, como rama fundamental de la genética, se dedica al estudio de la morfología, el número y el comportamiento de los cromosomas, con el objetivo de identificar alteraciones derivadas de enfermedades genéticas, variaciones asociadas a las condiciones ambientales ocupadas por diferentes especies o a la exposición a determinados contaminantes, así como trastornos en el desarrollo embrionario (de Bello Cioffi et al., 2018). Además, esta área permite la distinción entre individuos morfológicamente similares pertenecientes aparentemente a la misma especie, en los cuales la similitud fenotípica dificulta la inferencia de relaciones de parentesco basadas exclusivamente en la morfología externa (Gavazzoni et al., 2022, 2018; Tonello et al., 2022). Con la reciente redescritción de *P. brachypomus* y la descripción

de *P. orinoquensis*, los únicos datos citogenéticos disponibles hasta el momento describen a *P. brachypomus* con un número diploide ($2n$) de 54 cromosomas (Nirchio et al., 2003); sin embargo, *P. orinoquensis* no cuenta con estudios citogenéticos previos.

Debido a la alta demanda de cachama blanca, las técnicas de criopreservación de semen se han consolidado como un medio eficiente para mantener una elevada producción acuícola fuera del período reproductivo. No obstante, este proceso puede afectar la integridad genómica de los animales y provocar la sobreexpresión o subexpresión de genes cruciales para el desarrollo normal del individuo (Medina et al., 2025; Barros y Medina, 2022). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar la primera descripción cariotípica de *P. orinoquensis* y compararla citogenéticamente con ejemplares producidos a partir de la técnica de criopreservación.

Metodología

Se utilizaron un total de 6 ejemplares de cachama blanca ($n=6$) con peso vivo de 89.36 ± 23.79 g, longitud total 15.34 ± 1.27 cm; 3 obtenidos a partir de fertilización con semen fresco (no sometido a criopreservación) y 3 con semen criopreservado de acuerdo con la metodología de Medina et al., 2023. El semen fue diluido en un medio con concentraciones finales de 7.5% de dimetilsulfóxido (Me_2SO) como crioprotector, 4.1% de glucosa y 9.0% de yema de huevo, para luego ser congelado en un sistema de vapores de nitrógeno líquido empleando *dry shipper* durante 30 minutos y

posteriormente fueron almacenado en tanques de nitrógeno líquido a -196°C durante un año.

Los procesos experimentales y el manejo de los ejemplares fueron realizados bajo las directrices internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, establecidas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011). Para la obtención de los cromosomas se empleó como base la metodología descrita por Bertollo et al. (1978) realizando algunas modificaciones para que esta se adaptara mejor a la especie trabajada. Se seleccionó como órgano fuente el riñón; inicialmente se inyectó a los ejemplares dos dosis de solución de *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen, 1837). Pasadas 48 horas se inyectó solución de colchicina al 0.025% (1 mL/100 g de peso) y se permitió su libre nado durante 30 a 40 minutos.

Posteriormente, los animales fueron sometidos a eutanasia con Eugenol (200 mg/L), siguiendo recomendaciones aceptadas para organismos acuáticos, con el objetivo de inducir una pérdida rápida de la conciencia y minimizar el estrés, dolor y sufrimiento para extraer el riñón, cuyos tejidos se colocaron en 7-10 mL de solución hipotónica de KCl 0.075 M. Luego, mediante la ayuda de pinzas de disección y jeringa hipodérmica, se procedió a la disociación celular para obtener una suspensión, la cual fue incubada a 37°C durante 25-30 minutos. De manera seguida, se agregaron 10 gotas de fijador frío (metanol y ácido acético, 3:1) y se realizó la resuspensión del material; este se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.

El sobrenadante fue descartado y el sedimento se lavó dos veces en fijador, repitiendo la centrifugación bajo las mismas condiciones. Finalmente, después de eliminar el sobrenadante, el material fue resuspendido en 1 mL de fijador y almacenado en tubos tipo Eppendorf bajo refrigeración, garantizando así la conservación adecuada de las muestras para su posterior análisis. A continuación, fueron colocadas 3 gotas de la solución obtenida en láminas portaobjetos previamente calentadas

en agua a 58°C . Después de secas, se tiñeron las láminas con Giemsa en una relación 1:1 con tampón fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH= 6.8), para ser observadas mediante microscopía óptica en 100x. Las mejores metafases fueron capturadas utilizando un microscopio óptico marca Carl Zeiss Primo Star equipado con una cámara acoplada Axiocam ERc 5s. Las imágenes fueron editadas en el software Affinity ©, en el cual los cromosomas homólogos de las metafases fueron emparejados y organizados en grupos (metacéntricos, submetacéntricos, subtelocéntricos y acrocéntricos), siguiendo la clasificación propuesta por Levan et al. (1964), la cual define la relación de brazos (RB) de la siguiente manera: RB= 1.00–1.70, metacéntrico (m); RB= 1.71–3.00, submetacéntrico (sm); RB= 3.01–7.00, subtelocéntrico (st); RB >7.00, acrocéntrico(a).

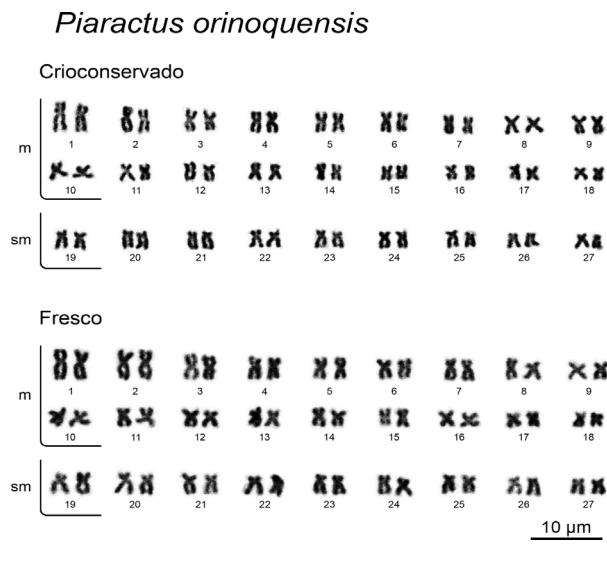
Resultados

El número diploide y la fórmula cariotípica encontrados fueron idénticos para ambos especímenes (tanto obtenidos con semen crioconservado como fresco), siendo $2n= 54$, $36m+18sm$, con ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos (Figura 1). En el grupo de "Crioconservado" ($n= 3$) se observan cariotipos con morfologías cromosómicas ligeramente más compactas en varios pares, mientras que en la sección "Fresco" ($n= 3$) se observan patrones similares en la mayoría de los individuos, con algunas variaciones puntuales. Los contornos y ejes de las parejas cromosómicas están marcados para cada par de cromosomas (1–27), con etiquetas numéricas que facilitan la identificación de los pares.

Discusión

El primer y único estudio que caracteriza citogenéticamente a *P. brachypomus* fue realizado hace 23 años, en el cual se demostró un número diploide de $2n= 54$ cromosomas (Nirchio et al., 2003), el mismo número observado en el presente estudio para *P. orinoquensis*. A pesar de que ambas especies presentan el mismo número cromosómico, una de las

Figura 1 Cariotipos obtenidos de progenies de cachama blanca (*Piaractus orinoquensis*)



diferencias encontradas corresponde a la fórmula cariotípica (*P. brachypomus*: 28m+26sm; *P. orinoquensis*: 36m+18sm). No obstante, es importante señalar que estas diferencias no son significativas y podrían estar relacionadas con discrepancias en los criterios de clasificación adoptados por distintos autores o con limitaciones metodológicas propias de la época en que se realizó el estudio previo.

Al analizar el cariotipo de *P. brachypomus* (Nirchio et al., 2003), no se observa una delimitación clara entre ambas especies cuando se considera únicamente la técnica de tinción con Giemsa. En este sentido, resulta necesario aplicar nuevas metodologías citogenéticas en ambas especies, tales como los marcadores clásicos de bandeo C (Sumner, 1972) y Ag-NOR (Howell y Black, 1980), así como marcadores moleculares, incluyendo los rDNAs 5S y 18S, ampliamente utilizados en peces neotropicales y que han demostrado ser eficaces en la delimitación de especies (Girardi et al., 2018; Piscor et al., 2015; Diniz et al., 2009; Peres et al., 2008).

La funcionalidad de los gametos que han sido sometidos a técnicas tradicionales de congelamiento

ha sido ampliamente estudiada en áreas de transferencia embrionaria en bovinos, en preservación de componentes celulares en humanos y en la conservación de recursos genéticos de anfibios en peligro de extinción (Mollard, 2018; da Cunha et al., 2014; Lin et al., 2013; Yalvaç et al., 2010). No obstante, no hay registros de este tipo de estudios en peces pese a ser la crioconservación seminal una técnica con bastante adopción en los últimos años por parte de los piscicultores, para obtener ejemplares fuera de las épocas de reproducción. Por tanto, este es el primer estudio que verifica este tipo de datos en peces derivados de semen crioconservado.

Si bien se ha demostrado que las técnicas efectivas de crioconservación mantienen una alta integridad del ADN y del cariotipo incluso después de períodos de tiempo prolongados (Ho et al., 2011; Steele et al., 2000), se ha debatido sobre el riesgo de causar daños directos sobre los componentes celulares e inducir la fragmentación del ADN (Jaiswal y Vagga, 2022). La formación de cristales de hielo que se originan del congelamiento del agua contenida dentro de las células, induce daño en el tejido de forma directa sobre la estructura del material genético o a través de la deshidratación excesiva y estrés hiperosmótico ocasionado por la liberación de solutos al medio extracelular, lo que ocasiona liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en la compactibilidad de la cromatina (Liu et al., 2016; Desrosiers et al., 2006). Sin embargo, las observaciones derivadas de este estudio evidencian que no se encontraron alteraciones significativas en los cromosomas obtenidos de ambos grupos experimentales, lo cual resulta relevante considerando que el objetivo era identificar posibles daños cromosómicos asociados al uso de semen crioconservado en peces.

Conclusión

Los resultados indican que la crioconservación del semen, aplicada bajo las condiciones metodológicas descritas, no genera alteraciones citogenéticas significativas, habilitando su uso seguro en

reproducción asistida y producción de ejemplares, al preservar la viabilidad e integridad genética de la progenie. Este hallazgo, que constituye el primer estudio de este tipo en *Porinoquensis*, posiciona al semen crioconservado como una herramienta eficaz y confiable para programas de mejora y conservación genética, al mitigar riesgos citogenéticos y promover la sostenibilidad productiva. Asimismo, futuros análisis citogenéticos podrían refinar la delimitación de especies y detectar posibles daños en la macroestructura cariotípica inducidos por este procedimiento.

Referencias bibliográficas

- Barros, O. J., & Medina, V. M. (2022). Parámetros de calidad espermática en semen crioconservado de peces dulceacuícolas. *Orinoquia*, 26(2). <https://doi.org/10.22579/20112629.764>
- Bertollo, S., Takahashi, O., Moreira, Bertollo, L., Takahashi, C., Moreira, O., & Moreira, O. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae) – *ScienceOpen*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=4830835c-a196-458a-ade1-35685ba3c68d>
- da Cunha, E. R., Martins, C. F., Silva, C. G., Bessler, H. C., & Bão, S. N. (2014). Effects of prolonged in vitro culture and cryopreservation on viability, DNA fragmentation, chromosome stability and ultrastructure of bovine cells from amniotic fluid and umbilical cord. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(5), 806–812. <https://doi.org/10.1111/rda.12372>
- de Bello Cioffi, M., Moreira-Filho, O., Ráb, P., Sember, A., Molina, W. F., & Bertollo, L. A. C. (2018). Conventional Cytogenetic Approaches—Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(4), 176–186. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0148-7>
- Desrosiers, P., Légaré, C., Leclerc, P., & Sullivan, R. (2006). Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertility and Sterility*, 85(6), 1744–1752. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.046>
- Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC. (2009). Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genet Mol Biol*, 32(1):37–41. doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000017>.
- Escobar, M., Farias, I., & Hrbek, T. (2022). Genetic comparison of populations of *Piaractus brachypomus* and *P. orinoquensis* (Characiformes: Serrasalminidae) of the Amazon and Orinoco basins. *Neotropical Ichthyology*, 20(3). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2022-0056>
- Escobar, M., Ota, R., Machado-Allison, A., Andrade-López, J., Farias, I., & Hrbek, T. (2019). A new species of *Piaractus* (Characiformes: Serrasalminidae) from the Orinoco Basin with a redescription of *Piaractus brachypomus*. *Journal of Fish Biology*, 95(2), 411–427. <https://doi.org/10.1111/jfb.13990>
- Gavazzoni, M., Paiz, L. M., Oliveira, C. A. M., Pavanelli, C. S., Graça, W. J., Margarido, V. P. (2018). Morphologically Cryptic Species of the *Astyanax bimaculatus* "Caudal Peduncle Spot" Subgroup Diagnosed Through Cytogenetic Characters. *Zebrafish*, 00(00):1–7. doi: <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1574>
- Gavazzoni, M., Brezinski, F. C., Pedroso, T. H., Pavanelli, C. S., da Graça, W. J., Blanco, D. R., et al. (2024). Integrative Taxonomy Suggests Resurrection of Species of the *Astyanax bimaculatus* Group (Characiformes, Characidae). *Zebrafish*, 21(5), 349–359. Doi: <https://doi.org/10.1089/zeb.2024.0132>

- Girardi, S. C., Pavanelli, C. S., Margarido, V. P. (2018). Contributions to the systematic of Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes): basic and molecular cytogenetics on seven species of *Pimelodus* from three Brazilian hydrographic systems. *Neotropical Ichthyology*, 16(2):1-16. doi: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170148>
- Ho, C. K., Choi, S. W., Siu, P. M., & Benzie, I. F. F. (2011). Cryopreservation and storage effects on cell numbers and DNA damage in human lymphocytes. *Biopreservation and Biobanking*, 9(4), 343-347. <https://doi.org/10.1089/bio.2011.0024>
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36(8):1014-5. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01953855>.
- Jaiswal, A. N., & Vagga, A. (2022). Cryopreservation: A Review Article. *Cureus*, 14(11), e31564. <https://doi.org/10.7759/cureus.31564>
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52(2):201-20. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>.
- Lin, P. Y., Yang, Y. C., Hung, S. H., Lee, S. Y., Lee, M. S., Chu, I. M., & Hwang, S. M. (2013). Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field. *Cryobiology*, 66(3), 256-260. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.02.061>
- Liu, T., Gao, J., Zhou, N., Mo, M., Wang, X., Zhang, X., Yang, H., Chen, Q., Ao, L., Liu, J., Cui, Z., & Cao, J. (2016). The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage. *Cryobiology*, 72(3), 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.04.004>
- Medina, V., Barros, O., Mira, T., Guaje, D., Suárez, R., & Ramírez, J. (2025). Long-term cryostorage of yamú (*Brycon amazonicus*) semen and commercial scale trials. *Revista MVZ Cordoba*, 30(3). <https://doi.org/10.21897/rmvz.3601>
- Medina, V., Sandoval, L., Suárez, R., Gómez, E., Guaje, D., & Cruz, P. (2023). Cryostorage of white cachama (*Piaractus orinoquensis*) sperm: Effects on cellular, biochemical and ultrastructural parameters. *Aquaculture Reports*, 29, 101477. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101477>
- Mollard, R. (2018). Culture, cryobanking and passaging of karyotypically validated native Australian amphibian cells. *Cryobiology*, 81, 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.03.004>
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.). National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- Nirchio, M., Ron, E., Fenocchio, A. S., Swarça, A. C., Pérez, J. E., Granado, A., & Estrada, A. (2003). Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachipomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Caryologia*, 56(4), 405-411. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589351>
- Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C., Filho, O. M. (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genet Mol Biol*, 31(1), 222-6. doi: <https://doi.org/10.1590/s1415-47572008000200009>.
- Piscor, D., Alves, A. L., Parise-Maltempi, P. P. (2015). Chromosomal microstructure diversity in

three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: Comparative analysis of the chromosomal locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish*, 12(1):81-90. doi: <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1036>.

Steele, E. K., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2000). Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA.

Sumner A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*, 75, 304-6.

Tonello, S., Blanco, D. R., Cerqueira, F. J., Lira, N. L., Traldi, J. B., Pavanelli, C. S., et al. (2022).

High rDNA polymorphisms in *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae): new insights about the cryptic diversity in *A. bimaculatus* species complex with emphasis on the Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, 20(2):1-21. doi: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0147>.

Yalvaç, M. E., Ramazanoglu, M., Tekguc, M., Bayrak, O. F., Shafigullina, A. K., Salafutdinov, I. I., Blatt, N. L., Kiyasov, A. P., Sahin, F., Palotás, A., & Rizvanov, A. A. (2010). Human Tooth Germ Stem Cells Preserve Neuro-Protective Effects after Long-Term Cryo-Preservation. In *Current Neurovascular Research* (Vol. 7).