

2016

## Descripción de la espermatogénesis en el caballo empleando la biopsia testicular: descripción de 3 casos

Natalia Mejía Romero  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)



Part of the [Large or Food Animal and Equine Medicine Commons](#)

---

### Citación recomendada

Mejía Romero, N. (2016). Descripción de la espermatogénesis en el caballo empleando la biopsia testicular: descripción de 3 casos. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/186](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/186)

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



Descripción de la espermatogénesis en el caballo empleando la biopsia testicular:  
descripción de 3 casos

Preparado por

Natalia Mejia Romero

Director

Dr. Jair Pérez Osorio

Bogotá, Colombia

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



Descripción de la espermatogénesis en el caballo empleando la biopsia testicular:  
descripción de 3 casos

Preparado por

Natalia Mejia Romero

Director

Dr. Jair Pérez Osorio

Bogotá, Colombia

2016

## APROBACIÓN

DIRECTOR

JAIR PÉREZ OSORIO

---

JURADO

JUAN DAVID CÓRDOBA

---

JURADO

DIEGO JIMÉNEZ

---

## DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector	Hno. Alberto Prada Sanmiguel
Vicerrector Académico	Hno. Carlos Enrique Carvajal Costa
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Luis Fernando Ramirez Hernandez
Vicerrector De Promoción Y Desarrollo Humano	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
Vicerrector Administrativo	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Dra. Claudia Mutis
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón
Director del Programa	

Medicina Veterinaria

Dr. Fernando Nassar Montoya

Asistente Académica

Dra. Stefany Romero

## **AGRADECIMIENTOS**

Lo más importante en la vida es hacer lo que amas así nunca tendrás que trabajar y esa es la razón por la que estudie esta carrera que aunque está llena de esfuerzos y sacrificios te regala muchos momentos de satisfacción, uno de ellos es culminar la etapa de estudiante para convertirse en una profesional. Por eso hoy quiero darle las gracias primero que todo a Dios, a mi familia que ha estado desde siempre a mi lado apoyándome en los momentos buenos y malos, siempre con una sonrisa y con palabras sabias: Carmenza Romero, Alcides Mejía, Carlos Mejía, Dora Romero, Santos Romero, Silvia Romero, Maryem Romero, Silvia Salguero, Andrés Romero, a mi abuelito Candido Romero que me heredo el amor por los animales, a mi director de tesis, el Doctor Jair Pérez Osorio porque fue un apoyo incondicional, por todos los conocimientos que me brindo durante este tiempo y sobre todo por su tiempo y consejos, a la Doctora Iovanna Castellanos por su apoyo en el trabajo , a todos los profesores que hicieron no solo parte de mi formación académica sino que también me ayudaron a formarme como persona, a mis amigos que han estado hay apoyándome en los momentos difíciles y que a su vez me han brindado grandes enseñanzas, y a todas las personas que de una u otra manera aportaron para mi formación académica y personal y que marcaron mi vida.

Por ultimo a la policía nacional por el todo el apoyo que me brindaron para poder realizar el trabajo y a todas esas personas que de un modo u otro dieron su aporte para la realización de este trabajo, muchas gracias.

## RESUMEN

La azoospermia es un problema de alta incidencia en los caballos en el país y muchas veces su diagnóstico no es adecuado ni oportuno, es por esto que la biopsia testicular se ha convertido en una herramienta diagnóstica importante ya que nos permite conocer de una manera profunda y detallada como se encuentra el proceso de espermatogénesis en el semental equino, este proceso complejo tiene una duración de 57 días aproximadamente y consta de una serie de eventos y fases críticas que ocurren en lugares específicos de los túbulos seminíferos en donde a partir de una espermatogonia se da origen a un espermatozoide. El objetivo de este trabajo es describir el proceso de la espermatogénesis a partir de dos métodos diferentes de biopsia testicular los cuales son biopsia a través de aspiración con aguja fina y biopsia a través de aguja tru-cut, estos dos métodos nos permiten conocer de una manera clara y detalla el estado del testículo del semental de esta manera podremos saber si el proceso de espermatogénesis se está realizando de una manera adecuada y si el problema de azoospermia que presenta el semental es o no reversible, además de ello nos permiten tener una idea clara del estado testicular del semental sin necesidad de retirar todo el órgano y con el menor número de efectos secundarios si la biopsia es tomada de una manera adecuada. Las muestras obtenidas fueron analizadas con la ayuda de un microscopio en donde además de buscar las células que nos permiten saber si el proceso de espermatogénesis se realiza adecuadamente se evaluó el estado testicular de los sementales en general. En conclusión la biopsia testicular es un método diagnóstico que nos permite decir con exactitud cuál es el estado del testículo y del proceso de espermatogénesis para así saber objetivamente cual es el futuro reproductivo del semental, de los dos métodos analizados, el más efectivo es la obtención de biopsia a través de aguja tru-cut ya que al obtener laminas histológicas no solo podemos ver el estado y la presencia de las células relacionadas con el proceso de espermatogénesis sino que además podemos ver la arquitectura de los túbulos seminíferos los cuales son fundamentales en el proceso de espermatogénesis y por ende en el futuro reproductivo de los sementales.



## **ABSTRACT**

Azoospermia is a problem of high incidence in horses in the country and often diagnosis is not suitable or timely, that's why the testicular biopsy is has become in an important diagnoses tool since allows us know deep and detailed the process of spermatogenesis in stallion, this complex process has a duration of 57 days approximately, it consists of a series of events and critical phases that occur on specific places in seminiferous tubules where a spermatogonium gives origin to a sperm. The objective of this study is to describe the process of spermatogenesis from two different methods of testicular biopsy, which are biopsy via fine needle aspiration and biopsy via tru-cut needle, they allow us know clearly and detailed the status of the testis of the stallion and off course if the spermatogenesis is being done properly and whether or not the problem of azoospermia presenting in the stallion is reversible or not, in addition the allow us to have a clear picture of testicular status stud without removing the hole organ and whit the least number of side effects if the biopsy is taken properly. The samples obtained were analyzed whit a help of a microscope where in addition to search them cells that allow us to know if the process of spermatogenesis is properly assessed the status of testis in general. In conclusion the testicular biopsy is a diagnostic tool that allows us to tell exactly what is the status of the testis, the status of spermatogenesis process and the reproductive future of the stallion, the biopsy obtained by tru-cut needle is more effective than the biopsy obtained by fine needle aspiration, because the biopsy obtained by tru-cut needle getting us histological sheets so we don't only see the presence of the cells related whit the spermatogenesis process but also can see it architecture of the seminiferous tubules which are fundamental in the process of spermatogenesis and therefore in the reproductive future of the stallions.

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo General.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. MARCO TEÓRICO.....	17
4.1 La Espermatogénesis.....	17
4.2 Regulación endócrina de la espermatogénesis.....	17
4.3 Espermatocitogenesis.....	17
4.4 Meiosis.....	18
4.5 Espermiogenesis.....	18
4.6 El papel de las células de Sertoli.....	18
4.7 Biopsia testicular.....	19
4.8 Técnicas para la obtención de biopsias testiculares.....	20
4.9 Aspiración con aguja fina (CAAF).....	20
4.10 Biopsia con aguja tru-cut.....	22
4.11 Análisis de la biopsia.....	22
4.11.1 Citología.....	22
4.11.2 Histopatología.....	22
4.11.3 Inmunohistoquímica.....	23
4.12 Degeneración testicular.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

5.1 Población muestra.....	24
5.2 técnica quirúrgica.....	24
5.2.1 Biopsia con aguja tru-cut.....	24
5.2.2 Biopsia por medio de aspiración con aguja fina (CAAF).....	26
5.3 Análisis.....	28
6. RESULTADOS.....	29
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
8. IMPACTO.....	33
9. CONCLUSIONES.....	33
10. CRONOGRAMA.....	34
11. REFERENCIAS.....	35

## Lista de tablas

TABLA1. Valores de referencia de aspiración con aguja fina en un semental clínicamente normal.

TABLA 2. Resultados obtenidos a través de biopsia por medio de aspiración con aguja fina (CAAF).

TABLA3. Resultados obtenidos a través de biopsia con aguja tru-cut.

TABLA 4. Cronograma de actividades.

## Lista de anexos

Anexo1. Ejemplares utilizados en la toma de muestras.

Anexo2. Aguja tru.cut esterilizada y lista para ser empleada en la muestra de la biopsia testicular.

Anexo 3. Realización de la incisión de 0.5mm en el lugar en donde será tomada la muestra.

Anexo 4. Biopsias testiculares sumergidas en formol salino al 10% listas para ser llevadas al laboratorio para su análisis.

Anexo 5. Posicionamiento del testículo en el escroto y localización del cuarto craneolateral para la toma de la muestra.

Anexo 6. Realización de la toma de la muestra a través de aspiración con aguja fina, en este caso con aguja calibre 21.

Anexo 7. Coloración laminas obtenidas con tinción giemsa

Anexo 8. Laminas obtenidas a través de los dos métodos de biopsia listas para ser evaluadas.

Anexo 9. Laminas obtenidas a través de los dos métodos de biopsia listas para ser evaluadas.

Anexo 10. Células de descamación obtenidas a través del método de aspiración con aguja fina (CAAF).

Anexo 11. Células de descamación obtenidas a través del método de aspiración con aguja fina (CAAF).

Anexo 12. Túbulos seminíferos con presencia de espermatides enlongadas.

Anexo 13. Túbulos seminíferos con presencia de espermatides enlongadas.

## 1. Introducción

Los sementales equinos realizan la producción espermática por medio de un proceso conocido como espermatogénesis en el cual mediante una serie de eventos y fases consecutivas las células se transforman y cambian progresivamente en lugares específicos de los túbulos seminíferos, una espermatogonia da origen a un espermatozoide luego de procesos de diferenciación y maduración, en su totalidad este proceso dura alrededor de 57 días y tiene tres fases fundamentales y críticas las cuales son: espermatocitogenesis, meiosis y espermiogenesis (1-4).

Para que este proceso se realice de una manera adecuada debe existir una regulación hormonal eficaz, la cual depende del normal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, en donde se involucran la acción de las gonadotropinas, el mecanismo de feedback de los esteroides, las proteínas y la modulación paracrina y autocrina de muchas sustancias y factores de crecimiento entre otros IGF1 ya que la producción espermática depende de la secreción de las diferentes hormonas en el organismo como hormonas metabólicas (GH, IGF1) (4,5).

Dentro de todo este proceso las células de Sertoli tienen un rol muy importante ya que no solo forman los testículos en la etapa embrionaria sino que a lo largo de la vida del animal se encargan de formar la barrera hemato-testicular esencial para la supervivencia de los espermatozoides, además de, proveer nutrición, protección y soporte además de regular la magnitud de la espermatogénesis determinando cuanto será la producción diaria (6-7)

En muchos sementales puede existir una serie de problemas que afecten este proceso tan importante y por lo tanto se ve afectada su función reproductiva, es por eso que en los últimos años se ha implementado el uso de la biopsia testicular como un método diagnóstico predictivo y como una herramienta alternativa para evaluar la función testicular y poder determinar algunos problemas reproductivos, ya que esta nos va a permitir establecer de una manera detallada las diferentes fases de la espermatogénesis y la visualización histológica de la función de los túbulos seminíferos para poder predecir si este proceso se lleva a cabo de una manera adecuada o no, además poder analizar si el daño que presenta el animal tiene carácter reversible o irreversible (8-15).

En el siguiente trabajo se pretende evaluar dos métodos diferentes que son la obtención de biopsia testicular mediante la aspiración con aguja fina y la obtención de biopsia testicular con aguja tru-cut para determinar cuál es más efectivo y cuál

de los dos nos permite evaluar adecuadamente el proceso de espermatogénesis en el semental equino (8-15).

## **2. Planteamiento del problema**

En Colombia la azoospermia es un problema de alta incidencia en los caballos, y muchas veces su diagnóstico no es oportuno y adecuado, por estas razones la utilización y el empleo de la técnica biopsia testicular se ha convertido en una de las herramientas más importantes empleándose como método diagnósticos alternativo que nos permite un conocimiento profundo y detallado del proceso de espermatogénesis en el caballo y de esta manera poder determinar si la azoospermia es pre testicular o post testicular, estableciendo el origen del cuadro clínico y así poder predecir con exactitud el futuro reproductivo del semental.



### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Analizar detalladamente el proceso de espermatogénesis en los animales evaluados, empleando la biopsia testicular utilizando dos métodos diferentes, aspiración con aguja fina y biopsia con aguja tru-cut.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Conocer cuál de los dos métodos empleados es el más eficaz y de mayor valor predictivo cuando se realicen biopsias testiculares en sementales con cuadros de sub e infertilidad.

Analizar láminas histológicas con el fin de determinar que células se deben encontrar en un semental que está realizando un proceso normal de espermatogénesis.

Determinar cuál es el método más seguro y efectivo para la obtención de biopsias testiculares en el caballo, sin tener efectos adversos en el parénquima testicular que comprometan el futuro reproductivo del animal.

Obtener información profunda y detallada del proceso de espermatogénesis en un semental equino a través de análisis histológicos.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 La espermatogénesis**

Los espermatozoides en los equinos adultos son producidos en el epitelio de los túbulos seminíferos en asociación con las células de Sertoli mediante un proceso que se denomina espermatogénesis el cual dura 57 días aproximadamente y que puede ser definido como la suma de todos los procesos de diferenciación y división por medio de los cuales se producen espermatozoides maduros a partir de espermatogonias. Es un proceso lento y complejo que contiene varias fases críticas las cuales pueden ser divididas en tres principalmente: espermatocitogenesis, meiosis y espermiogenesis (1-4).

### **4.2 Regulación endocrina de la espermatogénesis**

En todos los mamíferos la espermatogénesis depende del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, en donde se involucran la acción de las gonadotropinas, el mecanismo de feedback de los esteroides, las proteínas y la modulación paracrina y autocrina de muchas sustancias y factores de crecimiento entre otros IGF1 ya que la producción espermática depende de la secreción de las diferentes hormonas en el organismo como hormonas metabólicas (GH, IGF1) por otro lado la producción espermática depende a su vez de los patrones pulsátiles de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de las hormonas de la pituitaria anterior, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) y las hormonas testiculares como los andrógenos y la inhibina (4,5).

La testosterona es muy importante ya que mantiene y restaura el proceso de espermatogénesis en los testículos de animales adultos, mientras que la LH estimula la síntesis androgénica en las células de Leydig de los testículos; estos andrógenos regulan localmente la producción espermática y realizan un feedback negativo hacia el hipotálamo para controlar la liberación de GnRH y así la liberación de LH, por otro lado la FSH es de suma importancia en el inicio y expansión de la espermatogénesis en la pubertad, además, estimula a las células de Sertoli para que secreten inhibina B la cual tiene una acción de feedback negativo en la pituitaria controlando así la síntesis de FSH, incluso la FSH realiza un sinergismo con la testosterona para mantener cuantitativamente normal la espermatogénesis en los adultos (4,5).

### **4.3 Espermatocitogenesis**

Esta fase tiene una duración de 19.4 días en el caballo e involucra a las espermatogonias que son las células germinativas más jóvenes, estas células surgen en la fase postnatal de los gonocitos y se localizan en la base de los túbulos seminíferos en los adultos. Se caracteriza porque se da un proceso cíclico de mitosis que se produce a partir de una espermatogonia, las cuales, inmediatamente van a proliferar o se van a diferenciar en espermatocitos primarios, por otro lado, este proceso asegura la producción de nuevas células madre para asegurar el linaje de las mismas a lo largo de la vida adulta del macho (1,3).

#### **4.4 Meiosis**

Esta fase tiene una duración de 19.4 días en el caballo y se caracteriza porque se produce un intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, que ocurre en los espermatocitos primarios, este proceso, se puede dividir en dos fases, la primera de ellas es la fase preleptotena en la cual los cromosomas homólogos se duplican ellos mismos, y la segunda, es la fase cigotena en donde se da el comienzo del intercambio del material genético a través del apareamiento íntimo de los cromosomas homólogos en el complejo sinaptonemal (3).

La primera duplicación de los cromosomas es seguida por dos divisiones mitóticas, una separa los cromosomas homólogos apareados y la segunda separa las cromátidas hermanas, así los cromosomas haploides se vuelven espermatides (1,3).

#### **4.5 Espermiogenesis**

Esta es la última fase del proceso de espermatogénesis, tiene una duración de 18.6 días en el caballo, se caracteriza porque ocurre la diferenciación morfológica de las espermatides en espermatozoides. Las espermatides que se forman en la segunda división mitótica se diferencian de células esféricas a células con una cabeza aerodinámica la cual contiene enzimas de penetración, un núcleo condensado el cual lleva el genoma masculino y una cola que es necesaria para la motilidad, de esta manera se vuelven espermatides completamente diferenciados que al ser liberados del epitelio seminíferos serán espermatozoides (1,3).

#### **4.6 El papel de las células de Sertoli**

Los machos vertebrados dependen de las células de Sertoli a lo largo de su vida, en la etapa embrionaria estas células influyen la formación de los testículos, en esta fase, estas células se encargan de secuestrar las células germinales dentro de los túbulos seminíferos en formación y las inhiben para impedir que entren en

meiosis y en los adultos regulan el proceso de espermatogénesis regulando el ambiente de las células germinales (6,7).

Además de esto dentro de las funciones principales de las células de Sertoli se encuentra proveer un soporte estructural y nutricional de las células germinales en desarrollo, fagocitosis de las células germinales degeneradas y de los residuos, liberación de espermátides en la espermiación y producción de proteínas que regulan o responden a la liberación de hormonas pituitarias e influyen la actividad mitótica de la espermatogonia (1, 6,7).

Una de las funciones más importantes de las células de Sertoli es la formación de la barrera hemato-testicular, la cual se forma a partir de uniones estrechas entre las células de Sertoli adyacentes. Esta barrera se divide en un compartimiento basal y uno adluminal; en el compartimiento basal ocurre la espermatocitogénesis en donde se pueden encontrar las espermatogonias y los espermátocitos primarios; en la fase leptotema temprana los espermátocitos primarios migran a través de la barrera hemato-testicular hacia el compartimiento adluminal en donde ocurre el proceso de espermiogénesis (6).

Por otro lado esta barrera aísla los espermátocitos y las espermátides del sistema inmunológico del caballo adulto, ya que el sistema inmunológico no reconoce estas células como propias y por ende las atacará (1,6).

Por último las células de Sertoli están relacionadas con la magnitud de la espermatogénesis midiendo la producción espermática diaria por testículo, y a su vez están relacionadas con el peso testicular en los caballos (6).

Existe una relación entre las células de Sertoli y el rango de producción espermática, esta relación se extiende a los puntos más tempranos de la espermatogénesis en donde la relación del número de células de Sertoli y el número de espermatogonias A es consistente con el tamaño de un tipo de célula que influye en el tamaño de la población de la otra, es decir que esta relación se deriva del número de células de Sertoli y el número de espermatogonias (6).

#### **4.7 Biopsia testicular**

La biopsia testicular es una técnica invasiva que permite obtener un pequeño fragmento del parénquima testicular sin tener que removerlo por completo y sin afectar su funcionamiento normal; principalmente la biopsia testicular fue un método diagnóstico usado en la medicina humana, sin embargo, actualmente este método se usa en la medicina veterinaria con el fin de dar un diagnóstico más exacto y preciso (8).

Es sumamente importante saber cuál debe ser el sitio o la localización exacta para realizar la biopsia testicular con el fin de evitar el daño de las ramas principales de la arteria testicular y disminuir la presentación de hematomas, varios autores llegaron a la conclusión que el sitio ideal para la toma de la muestra de acuerdo a la anatomía topográfica del semental es la superficie lateral del testículo, más exactamente en el cuarto craneoventral del testículo (9).

Básicamente la biopsia testicular nos permite evaluar histológicamente el tejido del parénquima testicular y de los túbulos seminíferos sin necesidad de remover completamente el órgano, permitiéndonos conocer el estado de la estructura de los túbulos seminíferos y si el proceso de diferenciación de las células germinativas se está realizando de una manera adecuada (10,11).

Actualmente es una de las herramientas que se utilizan en el examen andrológico del semental equino, especialmente cuando al examen andrológico se han detectado condiciones de azoospermia u oligozoospermia o cuando por medio de exámenes como la palpación y la ultrasonografía se detectan neoplasias o cambios degenerativos y se quiere evaluar si existen o no cambios histológicos en el parénquima testicular (12-14).

Sin embargo se emplea como uno de los últimos recursos ya que el método es considerado como altamente invasivo y tiene efectos secundarios como hemorragia, necrosis, y adherencias tanto en el parénquima testicular como en los túbulos seminíferos por lo que esta técnica es utilizada únicamente en aquellos casos en los cuales otras técnicas no son concluyentes para llegar a un diagnóstico (11,13).

#### **4.8 Técnicas para la obtención de biopsias testiculares**

Se han descrito diferentes técnicas para la obtención de la biopsia testicular, unas más invasivas que otras y con mayor número de efectos adversos, entre las cuales principalmente se encuentran: biopsia con incisión, biopsia con aguja tru-cut, aspiración con aguja fina (8).

#### **4.9 Aspiración con aguja fina (CAAF)**

Es la técnica más reciente en la obtención de biopsia testicular, y se ha descrito tanto en humanos como en medicina veterinaria, permite evaluar el testículo de una manera rápida, económica y muy poco invasiva. Permite diferenciar los diferentes tipos de células testiculares a partir de su morfología, permite identificar las diferentes células en sus distintos estadios de desarrollo desde espermatogonias hasta espermátides (11,15).

Mediante esta técnica únicamente se obtiene células pero la muestra obtenida es suficiente para diferenciar enfermedades inflamatorias de aquellas no inflamatorias y también permite realizar diagnósticos de neoplasias (8).

La evaluación de la espermatogénesis se puede realizar mediante la comparación del número de células germinativas con el número de células de Sertoli (8).

Esta técnica se puede llevar a cabo con el animal en pie, en donde una vez el animal se prepara de una manera aséptica y adecuada, una aguja de calibre 22 que está conectada a una jeringa de 10ml es introducida por completo en el parénquima testicular en el cuarto cráneo lateral del testículo, con el material obtenido se realiza un frotis en una lámina la cual es secada al aire libre, se colorea con giemsa y se observa al microscopio (11).

En esta técnica es muy importante seleccionar adecuadamente el sitio de la punción para evitar el daño de la arteria lateral testicular, la vena central y los epidídimos, en caso de que del sitio de punción inicial no se obtenga una buena muestra se debe escoger un segundo sitio al lado o debajo del primero (15).

Dentro de las células que se pueden identificar por medio de la aspiración con aguja fina se encuentran células germinales, células de Sertoli, espermatozoides, eritrocitos, leucocitos y células neoplásicas, una vez realizada la identificación de los distintos tipos de células estas pueden clasificarse en: espermatogonias, espermatoцитos tipo 1, espermatoцитos tipo 2, espermátides tempranos, espermátides tardíos, espermatozoides y células de Sertoli (15).

Sin embargo como todas las técnicas de biopsia testicular esta tienen también una serie de desventajas dentro de las cuales la más importante es la posibilidad de causar trauma en la porción interna del testículo con la posibilidad de causar un daño permanente si esta no se realiza de una manera adecuada (8).

**Tabla 1. Valores de referencia de aspiración con aguja fina en un semental equino clínicamente normal.**

Cell types	Normal values <sup>a</sup>
Spermatogonia (%)	1.6 ± 1.1
Spermatocytes I (%)	3.4 ± 2.2
Spermatocytes II (%)	0.8 ± 0.7
Early spermatids (%)	25.5 ± 9.5
Late spermatids (%)	37.0 ± 9.3
Spermatozoa (%)	31.5 ± 8.5
Sertoli cells/ germ cells	20.9 ± 17.0
Macrophages/ germ cells	

Tomado de: Papa O, Leme D. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. J equine vet sci. 2002; 22: 121-124.

#### **4.10 Biopsia con aguja tru-cut**

La biopsia testicular por medio de la aguja tru-cut se puede realizar manualmente, este método consiste en una aguja que lo que hace es cortar y atrapar el tejido se utiliza para tomar muestras de parénquima testicular de manera muy poco invasiva (8,14).

El cuarto craneoventral del testículo es el lugar de elección para la toma de la biopsia testicular, porque permite evadir los vasos sanguíneos principales del testículo y la cabeza de los epidídimos, ya que si la biopsia llega a contener alguno de estas dos partes no es válida para la lectura en histopatología, pues no se pueden analizar los túbulos seminíferos que son los que nos indicarían en este caso como se encuentra el proceso de espermatogénesis en el semental (10, 12).

Se sugiere realizar una previa desinfección y posteriormente una pequeña incisión de 0,5 mm en el lugar de la toma de la muestra esto para permitir más fácil la entrada de la aguja tru-cut y para evitar que la muestra obtenida sea contaminada con piel escrotal u otras partículas que se puedan encontrar en la piel escrotal del animal (12).

Por otro lado la experiencia del veterinario que toma la muestra es esencial, ya que muchas veces personas inexpertas obtienen una biopsia no válida para el diagnóstico histopatológico pues toman muestras que contiene piel escrotal o fragmentos testiculares demasiado pequeños, además de ello pueden causar grandes hematomas al retirar el tru-cut antes de que este tome la muestra necesaria (12).

Uno de los principales efectos secundarios es el riesgo de dañar el testículo internamente y que ese daño pueda ocurrir de una forma permanente, además de causar fibrosis o grandes hematomas al momento de la toma de la muestra (8, 12).

#### **4.11 Análisis de la biopsia**

##### **4.11.1 Citología**

Es una manera rápida de evaluar los componentes celulares de los túbulos seminíferos además de sus características. Además de analizar el testículo como un órgano productor de espermatozoides (8,11).

##### **4.11.2 Histopatología**

Por medio de esta técnica se puede realizar un análisis más profundo y detallado de la arquitectura e integridad tanto de los túbulos seminíferos como del parénquima testicular, ya que se pueden identificar una serie de anomalías en la arquitectura normal de los túbulos seminíferos, se puede evidenciar la disrupción del parénquima testicular, además de evaluar cambios anormales como fibrosis, hemorragias e inflamación (8, 10,12).

Por otro lado el análisis de la cantidad de túbulos seminíferos encontrados en la muestra analizada es muy importante ya que en un semental con un proceso de espermatogénesis normal debe tener entre 15 a 130 túbulos por muestra. Además de ello un semental considerado normal debe presentar túbulos seminíferos con espermatides enlongadas que deben ir entre un 25-60% del total de los túbulos seminíferos un rango inferior podría indicar alteraciones en el proceso de espermatogénesis (10).

La presencia de túbulos seminíferos con arresto de espermatides es un hallazgo anormal en un semental con testículos aparentemente normales, que si además se acompaña de alteraciones en la arquitectura de los túbulos seminíferos se podría decir que hay una reducción en la calidad cuantitativa y cualitativa de la espermatogénesis (10).

#### **4.11.3 Inmunohistoquímica**

Este análisis se utiliza para encontrar cosas más específicas como por ejemplo el hallazgo de anticuerpos específicos para identificar células proliferativas, encontrar la localización en la membrana de algunas proteínas, y para identificar la ubicación citoplasmática de los filamentos intermedios de la vimentina (10).

#### **4.12 Degeneración testicular**

En el examen citológico de una biopsia testicular obtenida mediante la técnica de aspiración por aguja fina de un caballo con degeneración testicular podremos encontrar un daño importante en la espermatogénesis ya que se encuentran un aumento en el número de células de Sertoli con un bajo número de células espermatogénicas maduras; además de ello; se puede apreciar un número elevado de macrófagos (11).

Por otro lado en el análisis histopatológico de una biopsia testicular de un caballo con degeneración testicular podremos encontrar una serie de anomalías espermatogénicas como son la vacuolización espermática y la pérdida de la arquitectura normal del epitelio de los túbulos seminíferos, el diámetro de estos



disminuye y se aprecian células espermáticas inmaduras en la luz de los mismos; también puede encontrarse fibrosis y calcificación del parénquima testicular (16)

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Población muestra**

Fueron utilizados 3 caballos de raza Belga los cuales se encontraban en edades entre los 2 y los 3 años de edad, con testículos normales, sin evidencia de orquitis, neoplasias o degeneración testicular, los cuales fueron seleccionados de manera aleatoria para la realización de las biopsias testiculares por medio de los dos métodos anteriormente mencionados, ya que son animales que posteriormente fueron sometidos al protocolo de la orquiectomía bilateral para ser empleados en los programas de adiestramiento clásico para patrulla en la policía nacional, en el criadero caballar mancilla.

### **Anexo 1. Ejemplares utilizados en la toma de muestras**



(MEJÍA, 2016)

### **5.2 Técnica quirúrgica**

#### **5.2.1 Biopsia con aguja tru-cut**

Se procede a realizar sedación de los caballos con un protocolo 0.8mg/kg de xilacina al 10%, una vez el efecto del sedante se presenta, se posicionan los caballos en decúbito lateral ya que aunque en la literatura se reporta que la biopsia puede ser obtenida con el animal en pie en este caso fue mucho más seguro realizarla con el caballo en el piso y realizando una contención física asegurado correctamente de miembros anteriores y posteriores, los testículos se

posicionan de tal manera que queden completamente en el escroto, la piel del escroto se limpia de una manera aséptica con una solución yodada.

Posteriormente se posicionan los testículos en el escroto y se realiza una incisión de aproximadamente 0.5 mm en el lugar en donde se va a realizar la toma de la muestra, con una mano se mantiene firme el testículo en el escroto y con la otra se toma el tru-cut y se posiciona verticalmente en el cuarto craneolateral del testículo, a través de la incisión realizada, se acciona el mecanismo para que la aguja pueda puncionar el testículo y así obtener la muestra deseada.

Una vez obtenida la muestra esta es puesta en formol salino al 10% y llevada al laboratorio para realizar las láminas histopatológicas que nos permitirán evaluar el proceso de espermatogénesis.

### **Anexo 2. Aguja tru-cut esterilizada y lista para ser empleada en la muestra de la biopsia testicular**



(MEJÍA, 2016)

### **Anexo3. Realización de la incisión de 0.5mm en el lugar en donde se tomara la muestra.**



(MEJÍA, 2016)

**Anexo 4. Biopsias testiculares sumergidas en formol salino al 10% listas para ser llevadas al laboratorio para su análisis.**



(MEJÍA, 2016)

### **5.2.2 Biopsia por medio de aspiración con aguja fina (CAAF)**

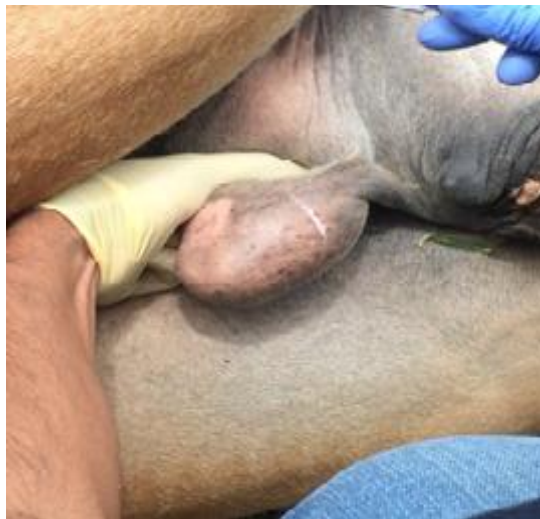
Al igual que en el procedimiento anterior los caballos son sedados con 0.8 mg/kg de xilacina al 10%, y se posicionan en decúbito lateral para la obtención de la

muestra con los miembros anteriores y posteriores asegurados de una manera adecuada, los testículos se limpian de una manera aséptica con una solución yodada.

El testículo se posiciona de tal manera que quede completamente en el escroto, se busca el cuarto craneolateral del testículo y se realiza una punción con una aguja de calibre 21 o 22, en este caso se realizó con una aguja calibre 21, esta aguja va acoplada a una jeringa de 10cm, una vez puncionado el testículo se debe succionar unas 3 veces durante 4 segundos de esta manera la muestra deseada quedara en la aguja.

Una vez obtenida la muestra se deposita en una lámina y se realiza un frotis, este debe dejarse secar durante unos segundos al aire y posteriormente ser coloreado con Giemsa, la lámina debe cubrirse en su totalidad con la tinción, posteriormente debe irse lavando suavemente con agua estéril hasta obtener un color plata una vez obtenido el color se deja secar la lámina para ser observada posteriormente en el microscopio.

**Anexo 5. Posicionamiento del testículo en el escroto y localización del cuarto craneolateral para la toma de la muestra.**



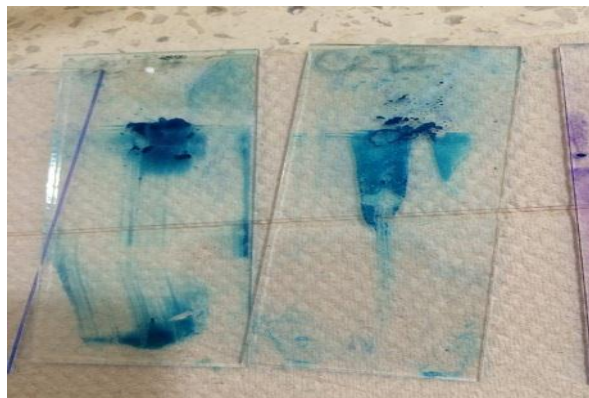
(MEJÍA, 2016)

**Anexo 6. Realización de la toma de la muestra a través de aspiracion con aguja fina, en este caso de calibre 21.**



(MEJÍA, 2016)

### **Anexo 7. Coloración de las láminas obtenidas con tinción giemsa.**

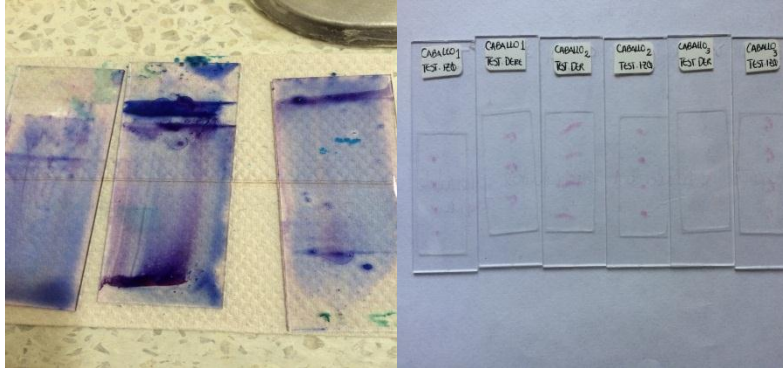


(MEJÍA, 2016)

### **5.3 Análisis**

Luego de la obtención de las láminas histológicas se deben analizar con la ayuda de un microscopio óptico convencional para así por medio de lo encontrado en la literatura determinar si en estos ejemplares equinos el proceso de espermatogénesis se está realizando de una manera adecuada y si en caso de encontrar que este tiene alguna anomalía esta podría ser la razón de la presentación de la azoospermia.

**Anexo 8. Láminas obtenidas a través de los dos métodos de biopsia listas para ser evaluadas.**



(MEJÍA, 2016)

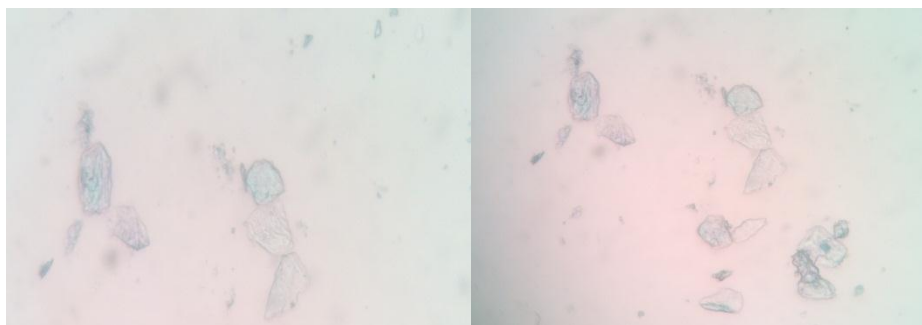
**6. Resultados**

Una vez elaboradas las láminas se obtuvieron 6 láminas de biopsias obtenidas a través del método aspiración con aguja fina, por otro lado, a través del método de aguja tru-cut se obtuvieron 6 láminas histológicas, las cuales con ayuda de un microscopio en un laboratorio fueron analizadas y los resultados fueron los siguientes:

**Tabla2. Resultados obtenidos a través de biopsia por medio de aspiración con aguja fina (CAAF)**

Testículo	Espermatogonia	Espermatocitos tipo 1	Espermatocitos tipo 2	Espermatide temprana	Espermatide tardía	Espermatozoide	Células de Sertoli
Caballo 1 TD	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Caballo 1 TI	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Caballo 2 TD	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Caballo 2 TI	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Caballo 3 TD	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Caballo 3 TI	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

**Anexo 10. Células de descamación obtenidas a través del método de biopsia aspiración con aguja fina (CAAF).**

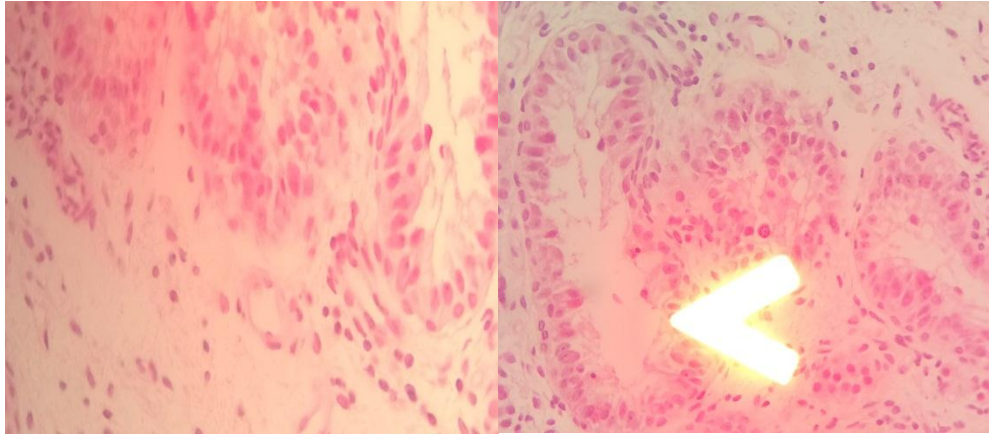


(MEJÍA, 2016)

**Tabla3. Resultados obtenidos a través de biopsia con aguja tru-cut.**

Testículo	Túbulos seminíferos	Túbulos seminíferos con espermátides enlongadas	Túbulos seminíferos con arresto de espermátides	Túnica albugínea	Epidídimos	Cambios en el parénquima testicular	Evidencia de disrupción del tejido testicular	Musculo
Caballo 1 TD	40	14		x				
Caballo 1 TI	26	Cuadro patológico	4	X (menos diferenciada)				X
Caballo 2 TD	86	35		X				X
Caballo 2 TI	35	13		X				
Caballo 3 TD	X (34 conductos epididimales)	X (34 conductos epididimales)	X (34 conductos epididimales)	X (34 conductos epididimales)	X (34 conductos epididimales)			
Caballo 3 TI	54	32		x				x

**Anexo 12. Túbulos seminíferos con presencia de espermátides enlongadas.**



(MEJÍA, 2016)

## 7. Discusión de resultados

Mediante el método de biopsia a través de aguja fina se debe obtener una muestra la cual nos permita analizar el estado del proceso de espermatogénesis del semental equino a través de la presencia de células como espermatogonias, espermatocitos tipo 1 y 2, espermatides tempranas y tardías, espermatozoides y células de sertoli, sin embargo, en las muestras obtenidas en el presente estudio no se obtuvieron las células deseadas, si no que por el contrario, se obtuvieron únicamente células de descamación es decir de piel las cuales no son viables para la evaluación de la espermatogénesis en el caballo, este puede deberse a que la muestra no fue tomada por personas con experiencia en la toma de la biopsia ya que autores como (Pereira & Lema, 2010) relatan que la falta de experiencia y practica puede alterar los resultados de la muestra tomada.

De acuerdo a los hallazgos encontrados podremos decir que el caballo 1 tiene un testículo derecho que está realizando un proceso de espermatogénesis normal ya que se encuentran 40 túbulos seminíferos por muestra analizada, lo que se encuentra dentro del rango (15-130 túbulos seminíferos) en un caballo normal, por otro lado de esos 40 túbulos seminíferos en 14 de ellos es decir un 35% se encuentran espermatides enlongadas lo que confirma la normalidad del testículo, pues el mismo autor plantea que en un semental equino normal este rango debe ir de 25-60%, además de ellos la muestra contiene túnica albugínea que según lo reportado por (Pearson et al., en 2011) es normal y además de ello no se encuentran cambios en el parénquima testicular ni evidencia de disrupción del tejido testicular.

Por otro lado el testículo izquierdo del mismo caballo 1 se encontraba un poco más pequeño de lo normal a la palpación y aunque se encontraron 26 túbulos seminíferos en la muestra analizada no se encontró ningún túbulo seminífero con



presencia de espermátides alargadas lo que podría sugerir según ( Rode et al., 2016) que el testículo tiene un proceso de espermatogénesis alterado además se encontró la presencia de túnica albugínea con ligera atrofia en su desarrollo, comparándola con el testículo anterior y una pequeña disrupción en el parénquima testicular lo que de acuerdo a (Pearson et al., 2011) sugiere una alteración en el proceso de espermatogénesis de un semental equino normal, posiblemente compatible con un cuadro de disgénesia testicular asociado a la presencia de un gen autosómico recesivo en el cual el caballo tiene un cuadro clínico de atraso en el desarrollo del testículo compatible con reducción del diámetro testicular probablemente asociado a hipoplasia testicular, que era el objetivo primordial de este estudio demostrar que la técnica de biopsia testicular nos auxilia en el diagnóstico clínico de alteraciones patológicas a nivel testicular que se evidencian no solo en animales maduros sexualmente, sino en animales jóvenes y en algunos animales adultos como algunas patologías testiculares específicamente neoplasias como seminomas.

En las biopsias testiculares del caballo 2 podemos encontrar la presencia de 86 túbulos seminíferos por campo en el testículo derecho y de 35 túbulos seminíferos por campo en el testículo izquierdo que de acuerdo a lo reportado por (Rode et al 2016) se encuentra dentro de los rangos normales (15-130 túbulos seminíferos) además de ello de estos 86, 35 de ellos es decir el 40% se encontraban con presencia de espermátides alargadas y de los 35 túbulos seminíferos del testículo izquierdo 13 es decir el 37% se encontraban con espermátides alargadas que como se mencionó anteriormente se encuentran dentro del rango de un semental equino normal , la túnica albugínea de ambos testículos era normal, se encontró un poco de musculo en la muestra obtenida del testículo derecho lo que no demuestra ninguna alteración y no se evidenciaron cambios en el parénquima testicular ni evidencia de disrupción del tejido testicular en ninguno de los dos testículos por lo que se puede decir que este caballo estaba realizando un proceso de espermatogénesis totalmente normal.

Al analizar las muestras obtenidas del caballo 3 en el testículo derecho no se encontraron túbulos seminíferos ya que la muestra obtenida correspondía a epidídimo lo que de acuerdo a lo reportado por (Pearson et al en 2011) corresponde a una muestra que no es viable para el análisis histopatológica y que se obtiene cuando el lugar de la toma de la muestra no es el indicado y es realizado por un veterinario que no es experto en la toma de este tipo de muestras. Sin embargo, en el testículo izquierdo la toma de la muestra fue bien realizada y el fragmento tomado fueron túbulos seminíferos por lo que esta muestra si sirvió para el análisis histopatológico, fueron hallados 54 túbulos seminíferos en la muestra que de acuerdo a (Rode et al en 2016) están dentro del

rango (15-130 túbulos seminíferos) en un caballo normal, de estos 54, 32 es decir el 59% contenían espermátides enlongadas en su interior, la túnica albugínea se encontraba bien definida, hay presencia de musculo y no se evidencia cambios en el parénquima testicular y tampoco se encuentra disrupción del tejido testicular por lo que se podría decir que el proceso de espermatogénesis en el testículo izquierdo del caballo 3 se está llevando a cabo de una manera normal.

Al realizar la sumatoria de todos los túbulos seminíferos encontrados en los testículos analizados y dividirlos en el total de numero de testículos estudiados encontramos que el promedio de túbulos seminíferos es de 48.2 lo que de acuerdo a (Rode et al en 2016) está dentro del rango de un semental equino normal que va de (15-130 túbulos seminíferos); por otro lado si realizamos el mismo ejercicio con los túbulos seminíferos que poseen espermátides enlongadas encontramos que hay un promedio de 47.9% que al compararlo con el resultado descrito por (Rode et al en 2016) está dentro del rango que presenta un semental equino en condiciones andrológicas normales.

## **8. Impacto**

En este relato de caso se pretende obtener un análisis detallado del proceso de espermatogénesis en los animales evaluados, con el fin de conocer cual método es el más eficaz y de mayor valor predictivo cuando se realicen biopsias testiculares en animales con cuadros de sub e infertilidad de manera que se obtendrá una información profunda y detallada del proceso de espermatogénesis a través de análisis histológicos seriados.

## **9. Conclusiones**

La biopsia testicular a través de la aguja tru-cut es el método más efectivo para la evaluación de la espermatogénesis, no solo porque el margen de error en la muestra es menor si no porque al analizar un corte histológico se pueden determinar si existen cambios morfológicos en los túbulos seminíferos que puedan alterar el proceso normal de espermatogénesis.

La experiencia es un factor importante en la obtención de la muestra de biopsia adecuada ya que a falta de experiencia se cometen errores que pueden alterar los resultados y que no nos permiten establecer como se encuentra realmente el proceso de espermatogénesis en el semental equino.

La biopsia testicular es un examen que nos permite analizar de una manera detallada el proceso de espermatogénesis a través de una pequeña muestra de tejido testicular sin necesidad de retirar el testículo.

La biopsia testicular es un método diagnóstico que nos ayuda a determinar de una manera detallada y profunda si la condición de sub fertilidad en el equino es permanente.

## 10. Cronograma

**Tabla 4. Cronograma de actividades**

Actividad	Septiembre 23	Septiembre 23	Septiembre 28	Octubre 5	Octubre 17
Toma de biopsias con aguja tru-cut	x				
Toma de biopsias aspiración con aguja fina	x				
Elaboración frotis y láminas con Giemsa	x				
Lectura laminas		x			
Lectura laminas histológicas			x		
Análisis de los resultados			x	x	
Análisis de los resultados					x

## 11. Referencias

1. Amaan R. Physiology and endocrinology. En: Equine Reproduction. 2da ed. Blackwell; 2011p. 1026-1052.
2. Johnson L, Varner D.D, Roberts M.E, Smith T.L, Keillot G.E, Scrutchfield W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. Animal Rep Sci. 2000; :471-480.
3. Johnson L, Blanchard T.L, Varner D.D, Scrutchfield W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. Theriogenology.1997;48: 1199-1216.
4. O'Donnell L, Meachem S.J , Stanton P.G , McLachlan R.I. Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Knobil and Neills physiology of reproduction. 3ra ed. Elsevier. 2006. P 1017-1069
5. Roser J. endocrine and paracrine control of sperm production in stallion. Animal Rep Sci. 2001;68:139-151.
6. Johnson L, Thompson Jr D.L. , Varner D.D. Role of sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Animal Rep Sci. 2008; 105:23-51.
7. Griswold M.D. The central role of sertoli cells in spermatogenesis. En: Cell & developmental biology. Washington.1998. p411-416.
8. Faber N, Roser J. Testicular biopsy. En: Current therapy in equine reproduction. 5a ed. Saunders; 2007.p. 205-211.
9. Smith J. Biopsy and the testicular artery of the horse. Equine Vet J. 2007; 6:81-83. Disponible en: [http:// onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1974.tb03934.x/](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1974.tb03934.x/)
10. Rode k, Sieme H, Otzen H, Schwennen C, Lüpke M, Richterich P, Schrimpf R, Distl O, Brehm R. Effects of repeated testicular biopsies in adult warmblood stallions and their diagnostic potential. J equine vet sci. 2016; 38:33-47.
11. Papa O, Leme D. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion whit testicular degeneration after external genitalia trauma. J equine vet sci. 2002; 22: 121-124.
12. Pearson L, Rodriguez J, Tibary A. how to obtain a stallion testicular biopsy using a spring-loaded Split-needle biopsy instrument. En: Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. San

Antonio 2011 Nov 8-11. Available on: International Veterinary Information Service (www.ivis.org)

13. Ball B. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. *J equine vet sci.* 2008; 28:650-665.

14. Carluccio A, Zedda M, Schiaffino G, Pirino S, Pau S. Evaluations of testicular biopsy by tru-cut in the stallion. *Vet Res Com.* 2003; 27: 211-213.

15. Leme D, Papa O. How to perform and interpret testicular fine needle aspiration in stallions. *J equine vet sci.* 2010; 30: 590-596.

16. Oristaglio RM. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. *Clin Tech Equine Pract* 6:278-284