

# 4

# Biopsia testicular en camélidos: Técnica, interpretación y casos clínicos

Ahmed Tibary y Agustín Ruiz

Servicio de Teriogenología Comparativa, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias.  
Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Estatal de Washington, Pullman, WA, EE. UU.

## Abstract

Testicular biopsy is an important technique for the investigation of causes of male infertility characterized by azoospermia, oligozoospermia or teratozoospermia. The four techniques are used in camelids (wedge biopsy, fine-needle aspirate, spring-loaded self-firing needle, and core needle biopsy) are described. Fine needle aspiration and spring-loaded needle technique are the most recommended by the authors. Cytological evaluation of fine-needle aspirate may be difficult for the beginner. Spring-loaded needle provides good histological samples and is excellent for diagnosis of inflammatory, degenerative, congenital, and neoplastic changes affecting spermatogenesis.

**Keywords:** Male, infertility, histology, spermatogenesis, pathology.

## Resumen

La biopsia testicular es una técnica importante para la investigación de las causas de la infertilidad masculina caracterizada por azoospermia, oligozoospermia o teratozoospermia. Las cuatro técnicas utilizadas en los camélidos (biopsia en cuña, aspirado con aguja fina, aguja auto retráctil cargada por resorte y biopsia con aguja gruesa) se describen. La aspiración con aguja fina y la técnica de aguja con resorte son las más recomendadas por los autores. La evaluación citológica del aspirado con aguja fina puede ser difícil para el principiante. La aguja con resorte proporciona buenas muestras histológicas y es excelente para el diagnóstico de cambios inflamatorios, degenerativos, congénitos y neoplásicos que afectan a la espermatogénesis.

**Palabras clave:** Macho, infertilidad, histología, espermatogénesis, patología.

## Introducción

La biopsia testicular no es un procedimiento de rutina para la evaluación de la salud reproductiva en el macho. Sin embargo, en algunos casos no se puede llegar a un diagnóstico y/o pronóstico de la fertilidad del macho basándose únicamente en el examen físico, la ecografía y la evaluación del semen. Se debe considerar la biopsia testicular en machos con una presentación de subfertilidad, asimetría testicular, ecografía testicular anormal no compatible con hematoma u orquitis y en casos de oligozoospermia, azoospermia o teratozoospermia. Esta técnica es útil para el diagnóstico de detención espermatogénica, oligospermatogénesis, hipogonadismo, inflamación y neoplasia (Pearson et al., 2011; 2014; Tibary, 2001; Waheed et al., 2014).

## Preparación del paciente

Independientemente de la técnica utilizada, la biopsia testicular debe realizarse bajo sedación profunda o anestesia general. Todos los machos que se someten a biopsia testicular en nuestra práctica reciben antibióticos de amplio espectro antes del procedimiento y durante 2 días después. En camellos y llamas, los machos son restringidos en una manga y sedados con una combinación de Xylazina HCL (0.1-0.2 mg/kg) y Butorfanol (0.05-0.1 mg / kg) o Detomidina (0.03-0.06 mg / kg, IM) y Butorfanol. En alpacas, nuestro método de elección es realizar la técnica con el animal bajo anestesia general inyectable con una inyección intramuscular de una combinación de Ketamina HCL (4 mg/kg), Xylazina HCL (0.4 mg / kg) y tartrato de Butorfanol (0.04 mg/kg). El área escrotal se prepara quirúrgicamente. La inyección subcutánea de lidocaína puede proporcionar una analgesia local del sitio de la biopsia.

## Técnicas

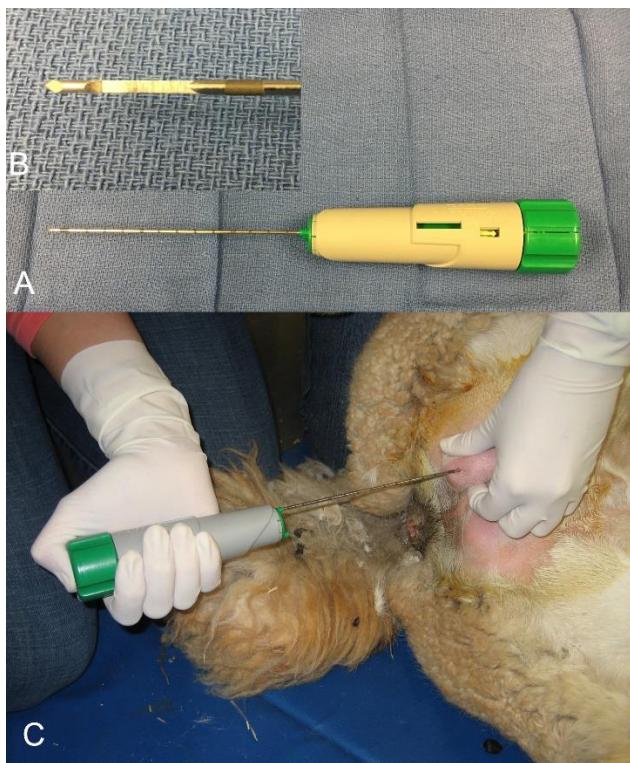
Se pueden considerar cuatro (4) técnicas para la evaluación del tejido testicular: 1) biopsia en cuña, 2) aspiración con aguja fina, 3) biopsia trucut con aguja de biopsia automática con resorte y 4) biopsia con aguja gruesa (Heath et al., 2002; Johnson y Schultheiss, 1994; Tibary, 2001).

**Biopsia en cuña:**

Denominada también biopsia incisional o abierta, esta técnica requiere anestesia general. Después de la preparación quirúrgica del escroto, se realiza una incisión (0,5 cm) sobre la piel, la túnica vaginal parietal y la túnica albugínea expuesta evitando las áreas vasculares. Se permite que el tejido testicular sobresalga de la incisión en la túnica albugínea y se incide con una hoja de bisturí. La túnica albugínea, la túnica vaginal parietal y la piel del escroto se cierran con sutura absorbible. Esta técnica produce muestras muy buenas para la evaluación histológica. Sin embargo, las complicaciones son más frecuentes e incluyen hemorragia, orquitis y fibrosis.

**Aspirado con aguja fina:**

La citología de aspirado con aguja fina es una técnica comúnmente utilizada para la evaluación de azoospermia y neoplasia testicular en varias especies. Es rápido, simple y económico. El tejido testicular se aspira con una aguja de calibre 20 y una jeringa de 12 ml. Se realiza una punción y se toman aspirados en tres o cuatro direcciones asegurándose de no incluir el epidídimo (Figura 1). Los frotis citológicos teñidos con DiffQuick® o May-Grunwald-Giemsa modificado se interpretan en función de los diferentes tipos de células espermatogénicas (Melaku et al., 2015).



**Figura 1.** Spring loaded self-firing biopsy technique. A) Biopsy instrument. B) Tip of the needle, C) technique for testicular biopsy

**Biopsia trucut con aguja de biopsia automática con resorte:**

Después de la preparación quirúrgica, se realiza una pequeña incisión (5 mm) sobre el escroto continuando a través de las envolturas testiculares con una hoja de bisturí quirúrgico #15 estéril. La túnica albugínea expuesta se penetra con una incisión en limpio. El instrumento (aguja de biopsia de calibre 14) (Figura 2, 3) se coloca al nivel de la incisión de la túnica albugínea y se dispara (Heath et al., 2002). La muestra, que generalmente mide 2 mm de ancho y entre 10 a 15 mm de longitud, se fija y se procesa para el examen histológico (Figura 3). El escroto queda abierto para cicatrizar por segunda intención. Los resultados obtenidos con esta técnica son más confiables, pero la hemorragia en el sitio de la biopsia es más frecuente.



**Figura 2.** Fine needle aspirate technique using a 20 gauge needle and 12 mL syringe.



**Figura 3:** Testicular biopsy sample taken with the Split-Needle spring loaded instrument.

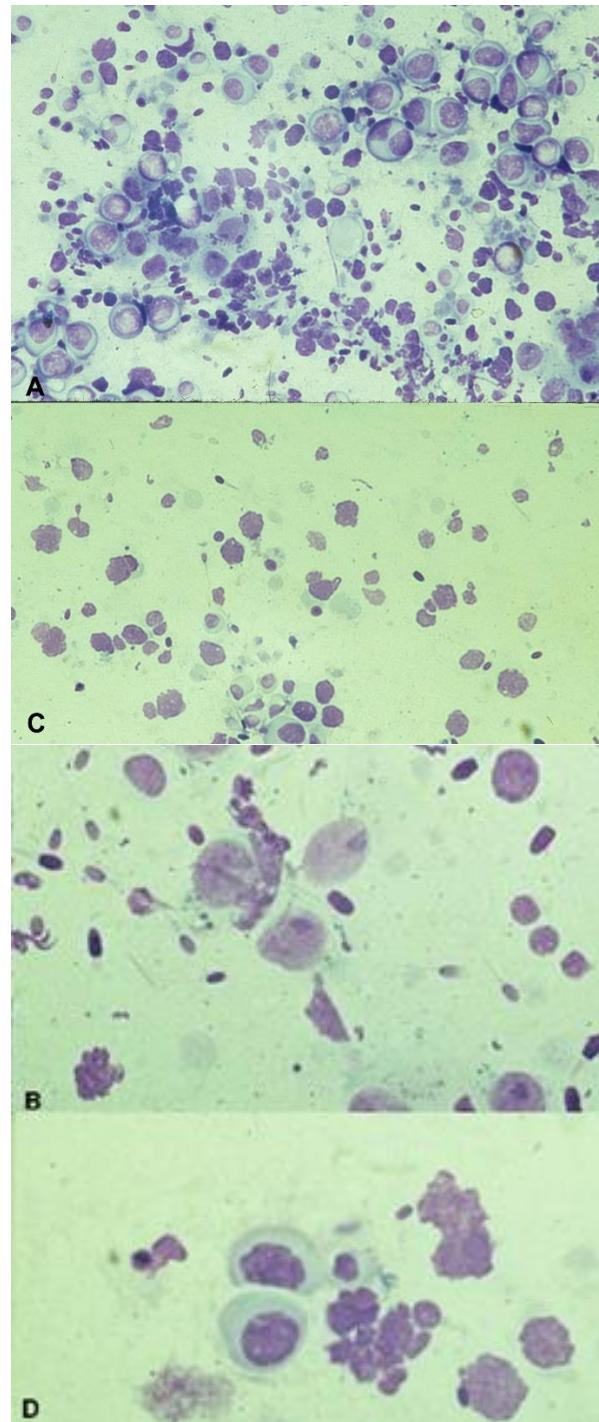
**Biopsia con aguja gruesa:**

Se puede realizar esta técnica con una aguja de 3.8 centímetros de largo y calibre 16. Después de la preparación quirúrgica de la piel del escroto, la aguja se introduce en el parénquima testicular y se redirige mediante movimientos suaves de empuje y tracción en 2 sitios diferentes. La aguja se retrae del tejido, mientras que un dedo se coloca sobre la base de la aguja para mantener la muestra. Se prepara un frotis directo a partir de la muestra obtenida.

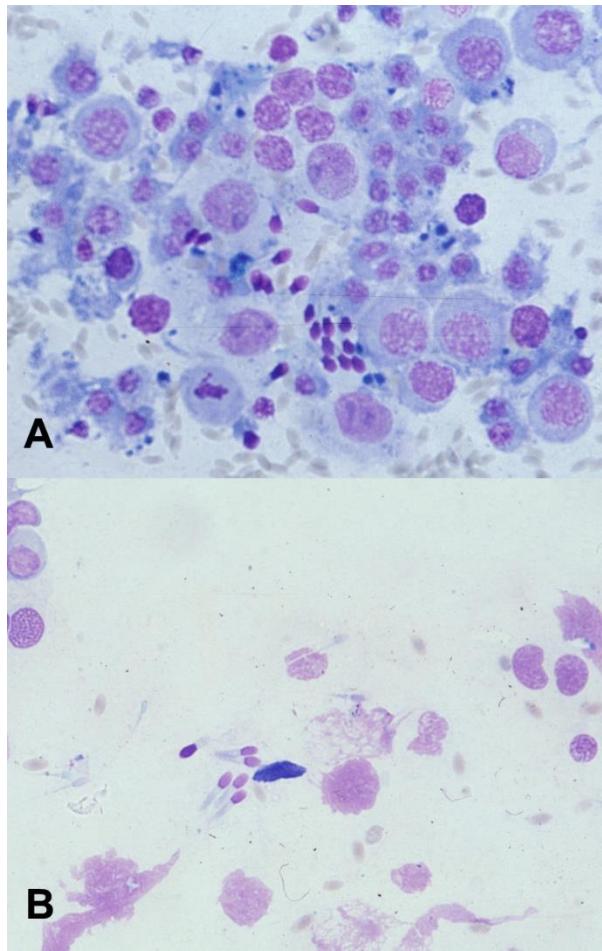
**Interpretación de resultados**

Aunque el tejido obtenido mediante biopsia en cuña proporciona buena información histológica, la técnica no es deseable porque se ha asociado con complicaciones graves tales como hematoma, hemorragia, adherencias, inflamación, reacciones autoinmunes y degeneración del epitelio germinal y tubular. Además, esta técnica puede causar una disminución transitoria en la producción de espermatozoa que dura varios meses.

El aspirado con aguja fina es muy seguro y no tiene un efecto negativo a largo plazo. Sin embargo, la interpretación de los frotis puede ser muy difícil. La frecuencia relativa de los tipos de células puede permitir la diferenciación entre hipospermatogénesis, el paro espermato genético y la espermato genésis normal. La interpretación de las muestras se basa en la evaluación de la cantidad de material celular y la identificación de los tipos de células. La cantidad de material celular específico (espermato genético, Sertoli y Leydig) recibe una puntuación de 0 a 3 (0 = sin células, 1 = poco, 2 = moderada, 3 = abundante). Las células espermato genicas se puntúan de 1 a 5 (1 = sin células espermato genicas, 2 = espermato gonias, 3 = espermatoцитos primarios, 4 = espermátidas, 5 = espermatozoides) (Figura 4). Una evaluación más detallada para determinar la proporción de tipos de células, índice espermático e índice de células de Sertoli en los frotis es siguiendo la técnica publicada por Stellella et al 2011. Sin embargo, esta técnica aún no se ha estandarizado en camélidos (Stellella et al., 2011).



**Figure 4.** Fine needle aspirate from a normal testicle with a score of 3 for cellularity (A) ( $\times 400$ ), and 5 spermatogenesis ( $\times 1000$ ) (B), and (C) score of 1 for cellularity ( $\times 400$ ), and (D) 3 spermatogenesis ( $\times 1000$ ) from an oligozoospermic male alpaca.



**Figure 5.** Examples of "Core" cytological samples A) Core biopsy from a normal testicle. Note the high cellularity compared to fine needle aspirate. B) Poor cellularity in oligozoospermic male (Ph. Courtesy Dr. LaRue Johnson).

**Tabla 1:** Sistema de clasificación para la evaluación histológica de biopsia testicular propuesta por Heath et al., 2002

Clasificación	Descripción
Grado 0	Epitelio seminífero normal (Figura 6)
Grado I	Epitelio seminífero con picnosis y descamación de espermátidas o vacuolización local
Grado II	Epitelio seminífero con cambios intermedios entre grado I y grado II (Figura 7)
Grado III	Túbulos seminíferos mayormente con espermatogonias y células de Sertoli (Figure 8)
Grado IV	Epitelio con células de Sertoli en su mayoría vacuoladas, los túbulos se contraen con una luz irregular y evidente engrosamiento peritubular (Figure 9)
Grado IVa	Túbulos hipoplásicos con células de Sertoli únicamente y sin vacuolización (pequeños túbulos sin lumen o engrosamiento peritubular) (Figura 10)
Grado V	Ausencia de epitelio. Solamente membrana basal
Grado VI	Spermastasis, granuloma espermático o mineralización
Grado VII	Túbulos seminíferos con solamente presencia de tejido fibrótico (Figuras 11,12)

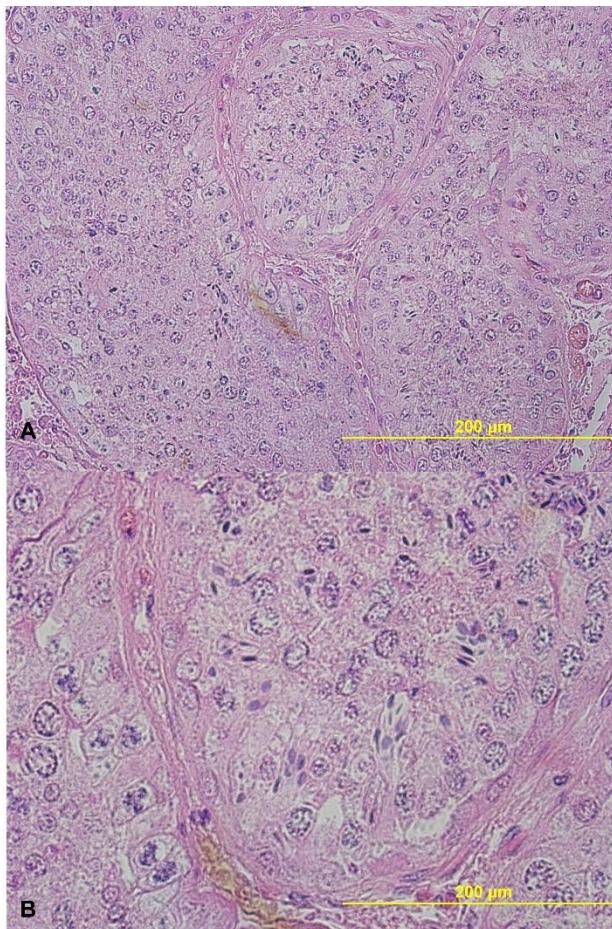
Otras anormalidades detectadas en estas biopsias incluyen cambios inflamatorios severos (Figura 13) y neoplasia (seminoma) (Figura 14) y desarrollo anormal de los túbulos seminíferos y rete testis (quística) (Figura 15).

El aspirado con aguja fina de animales azoospérmicos consiste en células de Sertoli solas, algunos espermatozoides maduros y escaso material celular o espermátidas, pero sin espermatozoides. La presencia de actividad espermatogénica normal en los casos de azoospermia puede sugerir la presencia de aplasia segmentaria u otras formas de azoospermia obstructiva. Las células espermatogénicas atípicas generalmente se asocian con neoplasia testicular (seminoma). No se obtienen células espermatogénicas de los testículos atróficos. Esta técnica tiene algunos defectos importantes, particularmente la dificultad de obtener una cantidad suficiente de material para el examen citológico en casos de cambios degenerativos severos. La cantidad de material aspirado obtenido depende de la consistencia de los testículos. Se obtiene una población celular muy baja cuando los testículos son blandos o duros. Veinticinco (25%) de las muestras obtenidas no son satisfactorias. La biopsia con aguja ancha proporciona más material celular que la biopsia con aguja fina. Sin embargo, esta técnica puede ocasionar lesiones graves en el parénquima testicular (Figure 5).

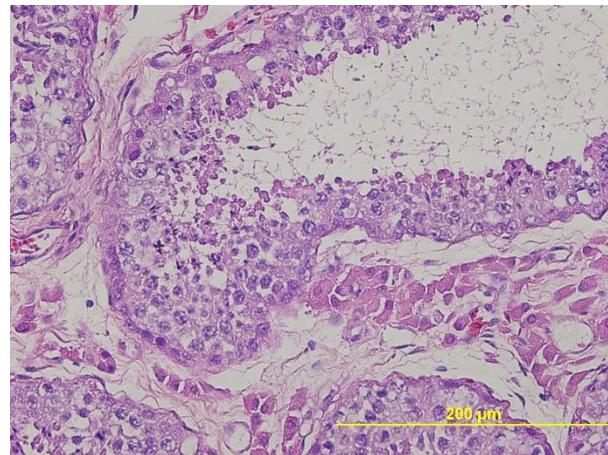
El instrumento de biopsia trucut con aguja de biopsia automática con resorte es el método más seguro que proporciona muestras más consistentes. La técnica ha sido utilizada rutinariamente en nuestro servicio en varias especies, incluidos sementales y camélidos. Es relativamente simple de aprender. La evaluación histológica requiere entrenamiento. Nuestra interpretación sigue las recomendaciones de Heath et al (Tabla 1). La técnica se puede realizar varias veces en el mismo paciente sin complicaciones graves.

En los últimos 20 años, se realizaron biopsias testiculares en 85 camélidos con diversas presentaciones (Tabla 2). Las principales complicaciones observadas son edema local o hematoma pequeño que desapareció después de 3 días. La causa más común de azoospermia es la

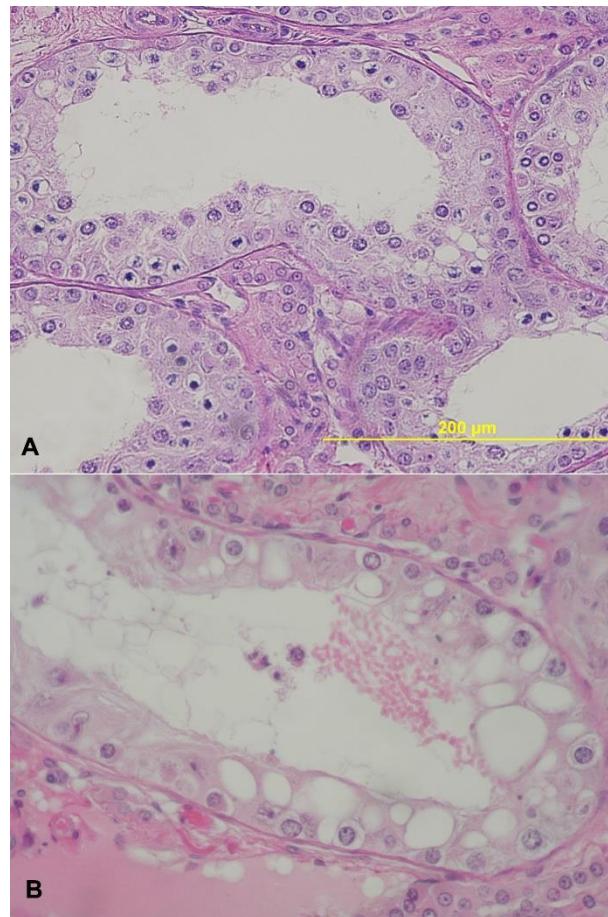
hipoplasia testicular y la degeneración testicular severa. En los casos de azoospermia con espermatogénesis normal, el diagnóstico fue aplasia del conducto deferente. La degeneración testicular también se asoció con oligozoospermia y teratozoospermia. Ejemplos de estos casos se ilustran en las Figuras 8 a 18.



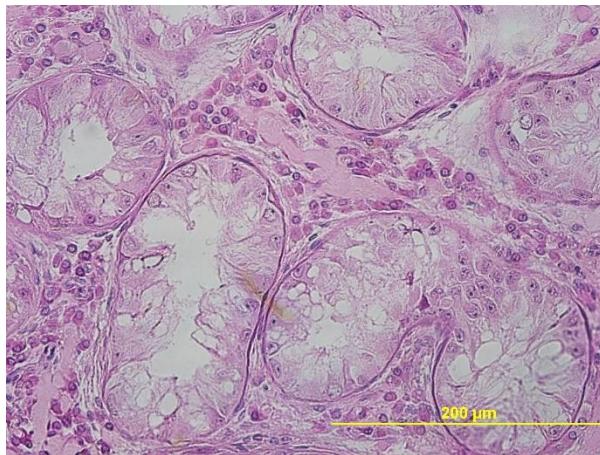
**Figura 6.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Normal testicle with normal spermatogenic activity (Grade I). A (x100), B (x 400).



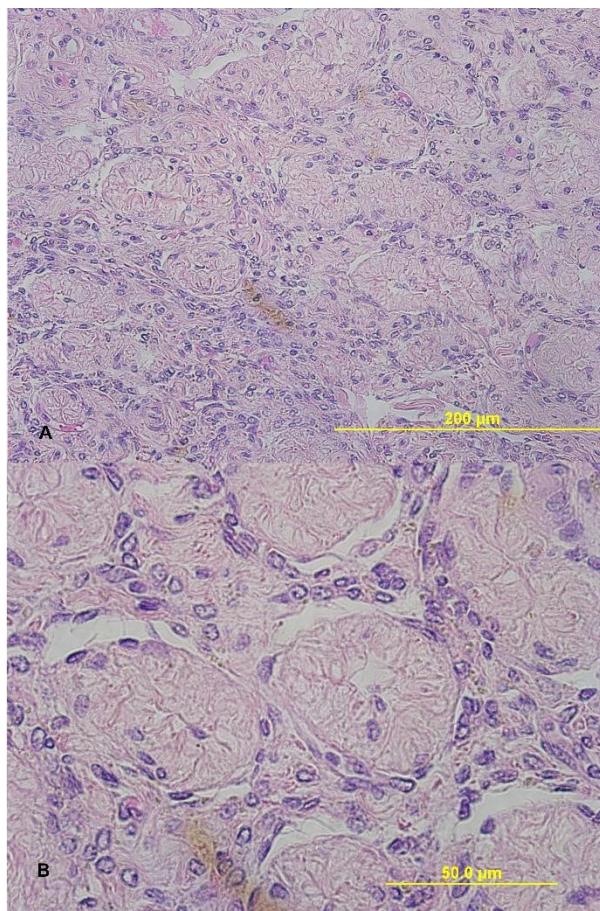
**Figura 7.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Seminiferous epithelium with pyknosis and desquamation of spermatids or focal vacuolization (Grade I-II).



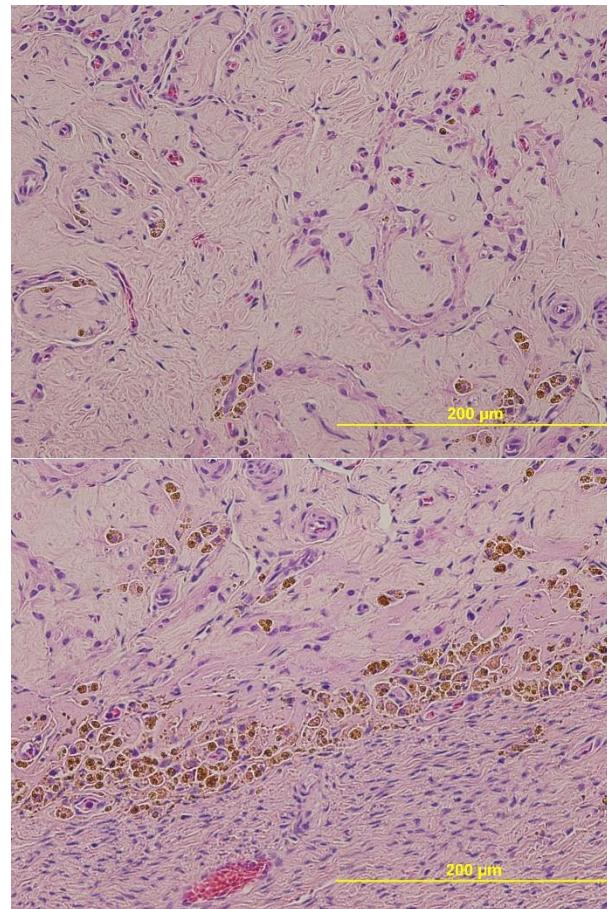
**Figura 8.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Seminiferous tubule with mostly spermatogonia and Sertoli cells (Grade III-IV). A) Some spermatocytes are presents. B) Severe degeneration.



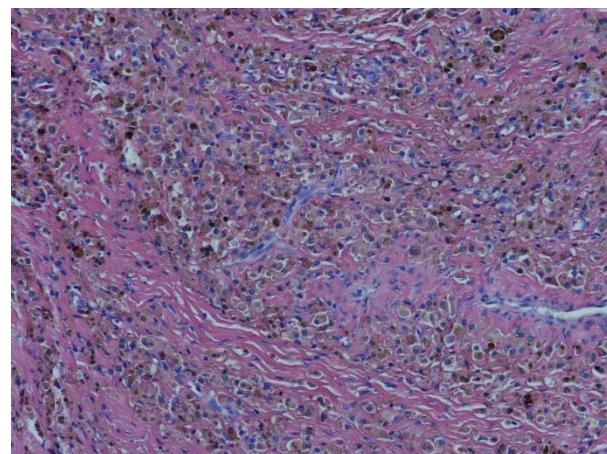
**Figura 9.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Epithelium with mostly vacuolated Sertoli cells, the tubules are shrunken with an irregular lumen and apparent peritubular thickening.



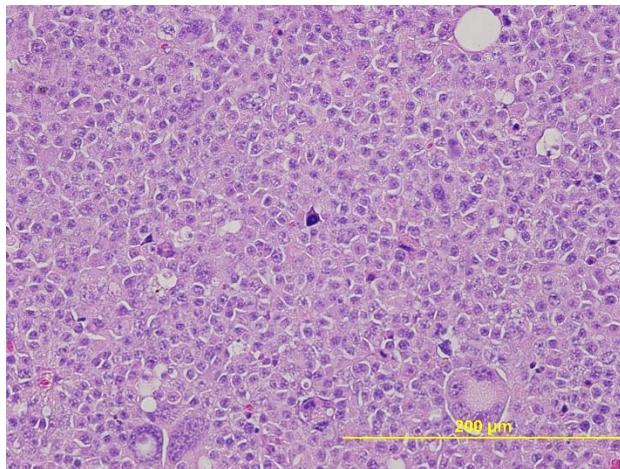
**Figura 10.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Hypoplastic tubules with Sertoli cells only and without any vacuolization (A, X100, B x 400) (small tubules without a lumen or peritubular thickening) (Grade IVa).



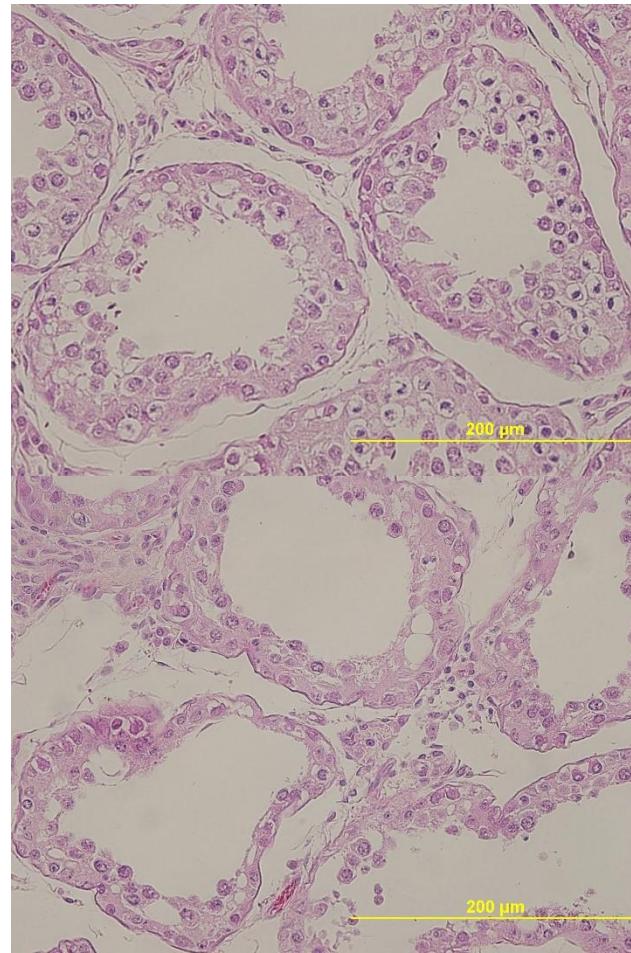
**Figura 11.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Severe testicular degeneration No epithelium leaving only basement membrane.



**Figura 12.** Spring-loaded biopsy instrument sample: severe inflammatory changes.



**Figura 13.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Seminoma.



**Figura 14.** Spring-loaded biopsy instrument sample: Abnormal seminiferous tubules with dilation and no spermatogenesis.

**Tabla 2:** Clasificación de biopsia testicular según presentación en casos clínicos.

Presentación	Número de animales (especie)	Clasificación	Diagnóstico final
Azoospermia	33 (26 alpacas, 2 llamas, 5 camellos)	Grado IVa	Hipoplasia bilateral congenita
Azoospermia	4 alpacas	Grado IV	Degeneración testicular severa
Azoospermia	9 (alpacas)	Grado 0	Blockeo bilateral de epididímo
Oligozoospermia	28 (18 alpacas, 8 llamas, 2 camellos)	Grado II	Degeneración testicular
Teratozoospermia	6 (5 alpacas, 1 camello)	Grado I-Grado II	Alpacas: estrés calórico Camellos: administración de testosterona
Atrofia testicular	5 (3 alpacas, 1 llama, 1 camello)	Grado III o Grado V	Trauma severo, orquitis

## Conclusión

De acuerdo con nuestra experiencia clínica, el mejor método para la evaluación histológica del parénquima testicular es el instrumento de biopsia con aguja encubierta. Este método proporciona una muestra adecuada y se puede repetir en el mismo individuo para una mejor precisión. Un método alternativo sería la aspiración con aguja fina. Sin embargo, esta técnica es más difícil de interpretar. Ambos métodos tienen tasas de complicaciones muy bajas si se realizan correctamente.

## Referencias

- Heath, A. M., Pugh, D.G., Sartin, E.A., Navarre, B., Purohit, R.C., 2002. Evaluación de la seguridad y eficacia de las biopsias testiculares en llamas. *Theriogenology* 58, 1125-1130.
- Johnson, L., Schultheiss, P., 1994. Resultados de biopsias testiculares en llamas. Simposio sobre la salud y la enfermedad de los pequeños rumiantes, Kansas City, Missouri, 1994; 54-55.
- Melaku, SK, Regassa, F., Tessema, TS, Kassa, T., Vencato, J., Owiny, DO, Stelle, C., 2015. Perfiles citológicos testiculares de camellos dromedarios machos aparentemente sanos durante los períodos de celo y no celo. *Anim Reprod Sci* 163, 105-111.
- Pearson, L.K., Rodríguez, J.S., Tibary, A., 2011. Cómo obtener una biopsia testicular de semental usando un instrumento de biopsia trucut con aguja de biopsia automática con resorte, Asociación Estadounidense de Profesionales Equinos (AAEP), Lexington, págs. 219-225.
- Pearson, LK, Rodríguez, JS, Tibary, A., 2014. Infertilidad y subfertilidad en el macho, en: Cebra, C., Anderson, D., Tibary, A., Van Saun, R., Johnson, L. (Eds.), *Atención de llamas y alpacas: Medicina, Cirugía, Reproducción, Nutrición y Salud de manada*, Elsevier, EE. UU., Pp. 194-216.
- Stelle, C., Juyena, N.S., Salazar, D.P., Ruiz, J., Gutiérrez, G., 2011. Citología testicular en la alpaca: Comparación entre portaobjetos impresos y manchados. *Anim Reprod Sci* 125, 133-137.
- Tibary, A., 2001. Ecografía testicular y biopsia en pequeños rumiantes y llamas. Actas de la Conferencia Anual de la Sociedad de Theriogenología, del 12 al 15 de septiembre de 2001, Vancouver, BC, Canadá, pp 369-378 200.
- Waheed, M.M., Ghoneim, I.M., Hassieb, M.M., Alsumait, A.A., 2014. Evaluación de la salud reproductiva de los camellos machos (*Camelus dromedarius*) mediante examen clínico, análisis de semen, ultrasonografía y biopsia testicular: un resumen de 80 casos clínicos. *Reprod Domest Anim* 49, 790-796.