

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**EVALUACIÓN DEL DAÑO A DISTANCIA PRODUCTO
DE BIOPSIAS TESTICULARES EN BOVINOS (*Bos taurus*)**

Jhon Alexander Miño Barragán

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Quito, 22 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**EVALUACIÓN DEL DAÑO A DISTANCIA PRODUCTO DE
BIOPSIAS TESTICULARES EN BOVINOS (*Bos taurus*)**

Jhon Alexander Miño Barragán

Nombre del profesor, título académico:

Pedro M. Aponte, PhD

Quito, 22 de diciembre de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Jhon Alexander Miño Barragán

Código: 00205428

Cédula de identidad: 1722484480

Lugar y fecha: Quito, 22 de diciembre de 2022

RESUMEN

La biopsia es un procedimiento ampliamente usado alrededor del mundo en análisis médicos y de fertilidad de diversos animales. En bovinos, la biopsia testicular es utilizada con frecuencia en análisis de la función del órgano para especímenes de interés reproductivo y comercial. Existe una controversia en la actualidad en torno a la posible afectación de la eficiencia de la espermatogénesis por el procedimiento de la biopsia en animales, por lo cual, el presente estudio busca determinar si efectivamente existe o no dicho daño en la zona de biopsia y en zonas distantes en el parénquima testicular. Para esto, se llevó a cabo una simulación de biopsia por aspiración con aguja en 4 especímenes cuya eficiencia de la espermatogénesis fue analizada. 61 días posterior a la simulación, se obtuvieron muestras de 4 zonas anatómicas del testículo, incluyendo a la zona de biopsia, y, mediante técnicas de histología y estereología se determinó la eficiencia de la espermatogénesis en 4 bovinos adultos. Una vez obtenidos los resultados, se utilizó el software estadístico SPSS para determinar si existe una variación significativa en la eficiencia del testículo biopsiado en comparación con un testículo control o entre la zona de biopsia con las otras 3 zonas testiculares analizadas en el estudio. Se determinó que no existe una variación significativa en la eficiencia de la espermatogénesis para ningún parámetro, por lo cual, se afirma que la biopsia es un procedimiento seguro que se puede continuar realizando con normalidad en estudios médicos y de fertilidad en bovinos.

Palabras clave: Biopsia, Espermatogénesis, Túbulo Seminífero, Espermátidas Redondas, Estereología.

ABSTRACT

A Biopsy is a procedure regularly used worldwide in medical and fertility analysis of various animals. In cattle specifically, testicular biopsies are frequently used for the analysis of organ function for specimens of reproductive and commercial interest. There is currently a controversy regarding the possible affectation of biopsies on the efficiency of spermatogenesis in these animals. Therefore, the present study seeks to determine whether such damage exists in the biopsy area and other regions of the testicular parenchyma. For this study, biopsy simulation by needle aspiration was conducted on 4 specimens whose efficiency will be analyzed. 61 days after the simulation, samples were obtained from 4 separate areas of the testicles, including the biopsy area. Using histological and stereological techniques, the efficiency of spermatogenesis was determined for the 4 selected specimens. Once the results were obtained, we used the SPSS statistical software to determine if there was a significant variation in the efficiency of the biopsied testicle compared to a control testicle or between the biopsied area and the other 3 testicular areas analyzed in the study. It was determined that there is no significant variation in the efficiency of spermatogenesis for any parameter; therefore, it is stated that the biopsy is a safe procedure that can continue to be performed normally in bovine medical and fertility studies.

Key words: Biopsy, Spermatogenesis, Seminiferous Tubule, Round Spermatids, Stereology.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	9
Métodos.....	11
Resultados	14
Discusión.....	16
Conclusiones.....	18
Tablas	19
Figuras.....	21
Referencias	23
Anexos.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la prueba t realizada para comparar la eficiencia entre testículos.....	19
Tabla 2. Resultados del modelo ANOVA usado para comparar la eficiencia entre bovinos	19
Tabla 3. Resultados del modelo ANOVA usado para comparar la eficiencia entre 4 zonas testiculares	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre testículos derecho e izquierdo	21
Figura 2. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre los 4 bovinos usados en el estudio.....	21
Figura 3. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre las 4 zonas analizadas	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Sitio de simulación de biopsia25

Anexo 2. Ejemplo de conteo de espermátidas redondas25

INTRODUCCIÓN

La biopsia es un procedimiento ampliamente usado en la actualidad, mismo que hace referencia a la extracción de un pequeño segmento de tejido, fluidos o un grupo de células a partir de un organismo para su posterior examen en laboratorio. Una biopsia puede llevarse a cabo en la piel, órganos y otras estructuras corporales, lo cual implica la existencia de diversos métodos de toma de muestras como la biopsia por punción, por aspiración (con aguja), endoscópica, por escisión, entre otras. Existen diversas razones por las cuales se puede realizar este procedimiento, como son el diagnóstico de enfermedades o anomalías en órganos o tejidos y el estudio de la biología y estado de la función de un órgano. Las muestras obtenidas a partir de una biopsia por lo general se analizan a través de la observación en el microscopio, en ocasiones tras haber pasado por un proceso de tinción previo (Cleveland Clinic, 2022).

Uno de los órganos en los cuales es común realizar biopsias es el testículo. Este órgano, mismo que forma parte del sistema reproductor masculino de los animales, tiene dos funciones principales: la producción de espermatozoides y de andrógenos. En el toro, al igual que en el ser humano, los testículos se localizan en la bolsa escrotal, fuera de la cavidad corporal, esto con el objetivo de mantener al órgano a una temperatura menor a la corporal para que los espermatozoides se puedan desarrollar con normalidad (Thomas, 2021). En bovinos es común realizar biopsias testiculares con el objetivo de realizar un diagnóstico de enfermedades o anomalías en el órgano, así como para realizar análisis de salud reproductiva y medición de la espermatogénesis en los animales (Crespilho et al., 2019).

La espermatogénesis hace referencia al proceso estrictamente regulado de división y diferenciación celular que ocurre en los túbulos seminíferos del testículo y que deriva en

la producción de espermatozoides o gametos masculinos. En los túbulos se pueden encontrar varios tipos de células somáticas y germinales, encontrando en el segundo grupo a espermatogonias, espermatoцитos y espermatidas (Staub & Johnson, 2018). En bovinos, la duración de la espermatogénesis es de 61 días, el equivalente a 4.5 veces la duración del ciclo del epitelio seminífero en estos animales. La eficiencia de la espermatogénesis comúnmente se mide a través del número de espermatozoides producidos por día por gramo de tejido testicular (Johnson, 1995).

En términos generales, una biopsia es considerada como un procedimiento seguro o de bajo riesgo, con una mínima probabilidad de infección y sangrado en el sitio de toma de muestra si dicho muestreo se realiza siguiendo protocolos adecuados (Standford Medicine, 2021). Aun considerando esto, existen varios reportes de afecciones a distancia de la biopsia en el parénquima testicular bovino, es decir, se menciona que la biopsia puede afectar el microambiente local y liberar señales que desregulen la espermatogénesis en túbulos más lejanos, afectando su eficiencia tanto en la zona de biopsia como en otras regiones. La controversia generada en la actualidad en torno a la posible afectación de este procedimiento causa incertidumbre en las diferentes áreas en las cuales el procedimiento es comúnmente usado, obligando a la búsqueda de nuevas alternativas para realizar análisis de este órgano.

Tomando esto en consideración, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto fisiológico de un proceso de biopsia mediante el método de aspiración con aguja en la zona testicular biopsiada y a distancia en el parénquima del órgano, y a la par solventar la controversia existente sobre la posible afectación de este procedimiento a la eficiencia de la espermatogénesis del animal.

MÉTODOS

Simulación de biopsia y castración

En primer lugar, se realizaron 4 biopsias simuladas en el testículo izquierdo de 4 toros de raza Holstein de 2 años en promedio, cerca del borde epididimario; (ver anexo 1). Previo a la punción se inyectaron aproximadamente 5 mL de lidocaína al 2% en la piel y tejido subcutáneo del escroto. Durante este procedimiento se usó una aguja hipodérmica de calibre 14 para la punción de uno de los testículos de cada individuo, mismos que fueron seleccionados al azar, en la zona adyacente al borde epididimario.

Sesenta días posterior a la biopsia se procedió a castrar a los 4 individuos. Para este procedimiento se sedó en primer lugar a los 4 animales usando Xilacina, y se los colocó en posición de decúbito lateral derecho para facilitar el proceso. Previo a la castración se inyectaron aproximadamente 15 mL de lidocaína al 2% en la piel y tejido subcutáneo del escroto y alrededor del cordón testicular. Se limpió la zona y se realizó una incisión en la zona distal de la piel del escroto, se realizaron ligaduras quirúrgicas alrededor de cada cordón espermático y se retiraron ambos testículos y poder realizar las disecciones y toma de muestras. El material obtenido (muestras de tejido de aprox. 1 mL) se colocó en solución fijadora de Bouins y se almacenó en una solución de etanol al 70% a 4 °C.

Evaluación histológica

Ambos testículos obtenidos a partir de cada uno de los 4 animales se lavaron con solución fisiológica. A posterior se ubicaron en cada testículo 4 zonas o regiones de las cuales se tomaron muestras: lugar de la biopsia (adyacente del borde epididimario), polo craneal, polo caudal y borde libre. Una vez obtenido el material y fijado en solución de Bouins por 24 horas, se llevó a cabo la inclusión en parafina, para lo cual los tejidos pasaron por un proceso de deshidratación en etanol con concentraciones de 75%, 96% y 100%.

Posterior a esto, se lavaron las muestras dos veces con xilol y se las incluyó en parafina con xilol en dos ocasiones, una en relación volumétrica de 1:1 y la segunda 2:1. Después, se colocó a las muestras en parafina pura a 55 °C para armar los bloques.

Una vez obtenidos los bloques para todas las muestras se realizaron cortes seriados de 5 µm de separación con la ayuda de un micrótomo Leica, mismos que fueron colocados en un portaobjetos y cubiertos con polilisina para permitir que estos se fijen adecuadamente. Una vez fijadas, se prepararon las muestras para su tinción con Hematoxilina de Harris, esto mediante 3 lavados con xilol y posteriormente con etanol con concentraciones desde decrecientes de 100% a 70% para rehidratarlas. Una vez terminado esto, se realizó otro lavado con agua destilada y se procedió a realizar la tinción por 30 segundos, colocando a posterior a todas las placas en un recipiente con agua corriente en constante agitación para retirar el exceso de colorante y permitir la alcalinización del colorante y que este vire a color azulado.

Para el montaje de las muestras estas se deshidrataron nuevamente con lavados en etanol en concentraciones de 70% a 100%, posterior a esto tres lavados con xilol y finalmente la adición de un medio de montaje y la colocación de un cubreobjetos. Es importante recalcar que se colocaron entre 2 a 4 secciones seriadas de tejidos por placa para la realización del contaje estereológico. Las placas se rotularon en base al número de individuo (1, 2, 3 o 4), sitio de toma de muestra, el testículo del animal (I o D), y la serie (A o B).

Visualización y toma de imágenes

La toma de imágenes se realizó mediante un microscopio óptico acoplado a una cámara digital que permite la visualización y captura de los campos ópticos en la computadora y la toma de imágenes. Primero se visualizaron las muestras de biopsia, seguidas por el

borde libre, polo caudal y polo craneal. Para cada una de las placas, se obtuvo a las series A y B y se procedió a buscar campos ópticos equivalentes a la misma región entre ambas con la mayor cantidad de secciones transversales de túbulos de forma redonda en la medida de lo posible (ver anexo 2). Al encontrar un campo útil en una de las series se buscaba el mismo en la siguiente y a posterior se procedió a tomar las fotos que se guardaron en el sistema y se subieron a un documento de One Drive.

Conteo celular

Con la ayuda de la aplicación Photoshop, se ajustó la calidad y contraste de las imágenes obtenidas, consiguiendo así diferenciar con mayor facilidad entre espermátidas redondas y espermatoцитos en paquitenos. Luego se colocó al azar una serie de 15 cuadrículas de 400 μm de perímetro en cada una de las imágenes y se contó solamente a las espermátidas que cayeron dentro de cada cuadrícula, exceptuando a los bordes izquierdo e inferior. Para el conteo, se revisó que las espermátidas estén presentes en una de las series de cada muestra y no en la siguiente (solo en A y no en B), siendo únicamente estas las que se reportaron, esto siguiendo el método del disector físico (Gunderssen, 1988).

Cálculos y estadística

Una vez obtenidos los datos del conteo, se registró la información en una hoja de cálculo Excel para obtener los datos de eficiencia de la espermatogénesis en millones de células por gramo de parénquima testicular. Los resultados se organizaron en base a 3 parámetros principales: una comparación entre individuos, entre testículos, y entre zonas, y se llevó a cabo el análisis en la variación de la eficiencia mediante el uso del software estadístico SPSS. Para la comparación entre testículos se utilizó una prueba t para muestras independientes, y para la comparación entre animales y zonas un ANOVA, ambos con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Comparación en el promedio de la espermatogénesis entre testículos

Como se observa en la figura 1, se evidencia una mayor eficiencia promedio en la espermatogénesis del testículo derecho de los animales, mismo que fue usado como control al no haber pasado por el proceso de biopsia simulada. Las medias de eficiencia obtenidas para cada testículo, expresadas en millones de células por gramo de tejido son 19.51 y 13.30 para los testículos derecho e izquierdo respectivamente.

Como se mencionó previamente, al trabajar únicamente con dos variables se utilizó una prueba t para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%, la cual tiene como enfoque comparar las medias de eficiencia de espermatogénesis entre ambos testículos para los 4 animales. Como se observa en la tabla 1, se obtuvo un valor p de 0.118, el cual es un indicativo de que la variación en los promedios de eficiencia entre ambos testículos no es significativa.

Comparación en el promedio de la espermatogénesis entre los 4 individuos

En la figura 2 se observan promedios similares para los animales 1, 2 y 4, con valores de eficiencia de 15.18, 14.37 y 13.58 respectivamente, y una eficiencia mayor para el animal 33, la cual tiene un valor de 22.38

Para comparar los promedios de eficiencia entre los 4 individuos se llevó a cabo un ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, esto ya que se trabaja con cuatro variables. Como se observa en la tabla 2, se obtuvo un valor p de 0.404, el cual es un indicativo de que la variación evidenciada entre los promedios de eficiencia entre los 4 individuos no es significativa.

Comparación en el promedio de la espermatogénesis entre las 4 zonas analizadas para el testículo izquierdo

Como se observa en la figura 3, se evidencia una mayor eficiencia promedio en la espermatogénesis de la zona de biopsia, con un valor promedio de 19.33 millones de células por gramo de tejido. Las medias reportadas para el borde libre, polo caudal y polo craneal son de 14.39, 6.10 y 5.56 respectivamente.

Para comparar los promedios de eficiencia entre las 4 zonas se llevó a cabo un ANOVA con un intervalo de confianza de 95%, esto ya que se trabaja con cuatro variables. Como se observa en la tabla 3, se obtuvo un valor p de 0.121, el cual es un indicativo de que la variación evidenciada entre los promedios de eficiencia entre las 4 zonas no es significativa.

DISCUSIÓN

Tomando en cuenta la amplia y creciente tasa de uso de la biopsia testicular en bovinos alrededor del mundo, es fundamental determinar si esta podría estar afectando a la eficiencia de su espermatogénesis. Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se afirma que un proceso de biopsia testicular no genera una afección a la eficiencia de la espermatogénesis del animal, observando en las tablas 1, 2 y 3 que no existe una variación significativa en la eficiencia medio para ninguno de los 3 parámetros analizados en el estudio.

En primer lugar, la variación entre animales se utilizó para determinar la fiabilidad de los resultados y descartar cualquier anomalía en alguno de los toros que pueda afectar a los resultados de estudio. Como se observa en la tabla 2, no existe una variación significativa en las medias de eficiencia de los animales, lo cual nos da confianza para analizar directamente la afección del proceso de biopsia. El comparar las medias de eficiencia entre ambos testículos nos permite determinar si la biopsia afectó de manera generalizada en el testículo a la eficiencia de la espermatogénesis. Al observar la tabla 1, vemos que no hay una variación significativa en las medias de eficiencia entre ambos testículos, lo cual demuestra que no existe una afección general del proceso de biopsia en ninguno de los animales.

Finalmente se buscó analizar la afección directa del procedimiento en la zona de biopsia, esto considerando que se han reportado distintos tipos de daño testicular en la zona de toma de muestra, entre los cuales se encuentran inflamación local, necrosis del tejido, cambios degenerativos y una menor tasa de espermatogénesis (Shufaro, Prus, Laufer, & Simon, 2022). Al igual que esto, estudios en otros mamíferos describen afecciones a

nivel inmunológico e inmunohistoquímico en la zona de biopsia e incluso una devascularización permanente, sin embargo, esto se agrava al llevar a cabo múltiples biopsias (Jequier, 2011) (Schlegel & Su, 1997).

Si observamos la tabla 3, determinamos que no existe una disminución significativa en la eficiencia de la espermatogénesis en la zona de biopsia en comparación con el polo craneal, caudal y borde libre, las cuales son las zonas más alejadas al sitio de muestreo del testículo en las cuales podemos encontrar túbulos seminíferos normales. Se evidencia entonces una recuperación normal del tejido al cabo de los 61 días de espera previo al muestreo, y una recuperación de los niveles normales de espermatogénesis. Este resultado concuerda con los postulados de Rajak et al. o Heath et al. en los cuales se evidencia una normalización del tejido biopsiado a lo largo del tiempo y una recuperación total y eficacia estándar de la espermatogénesis (Rajak et al., 2013) (Heath et al., 2002).

Es importante considerar que los toros utilizados en el estudio pasan por un único procedimiento de biopsia mediante aspiración con aguja, por lo cual no se está analizando el posible efecto de múltiples biopsias, el cuál podría demostrar diferentes resultados de los descritos en la presente investigación debido a varias reacciones inmunológicas y fisiológicas del órgano como las descritas previamente, muy posiblemente debidos a la ruptura de la barrera hemo testicular. En este caso, existe de igual forma una controversia sobre la afección al testículo, con estudios como el de Crespilho et al en 2019 que menciona que hasta 3 biopsias en el lapso de un mes permiten una recuperación total del tejido bovino, en contraposición a los estudios mencionados previamente (Crespilho et al., 2019).

CONCLUSIONES

En primer lugar, en base a los resultados obtenidos, se afirma que no existe una afectación a la espermatogénesis del animal ni en la zona de biopsia ni a distancia producto del procedimiento realizado. Por esto, se confirma que la biopsia es un procedimiento seguro que puede seguir realizándose con normalidad en análisis médicos, de fertilidad y de estado de la función testicular.

Considerando el tiempo de espera para llevar a cabo el muestreo tras efectuar la biopsia en esta investigación, el cual se deriva del tiempo de duración de la espermatogénesis en bovinos, se asevera que un periodo de 61 días posterior a la realización de una biopsia es suficiente para observar una total recuperación del tejido afectado directamente en el procedimiento y de la función normal del órgano en esta zona.

Se logró determinar de igual forma que el testículo bovino es un órgano resistente al estrés físico y fisiológico derivado de un procedimiento de biopsia, y que este puede recuperarse en su totalidad en un tiempo relativamente corto (61 días o menos), lo cual es alentador para futuros estudios y análisis enfocados en estos animales.

Finalmente, se recomienda ejecutar un estudio seriado (varios tiempos entre el día 0 y el día 60) enfocado en la medición de la eficiencia de la espermatogénesis en varias etapas del proceso de recuperación del tejido biopsiado, esto con el objetivo de analizar la afectación inicial y progresiva de este procedimiento y la tasa de recuperación del testículo bovino. Adicional a esto, se podría llevar a cabo un nuevo estudio enfocado en la afección de biopsias múltiples en el testículo bovino a lo largo de un período de tiempo determinado.

TABLAS

Tabla 1. Resumen de resultados de la prueba t realizada para compara la eficiencia entre testículos.

Independent Samples Test						
				t	df	Sig. (2-tailed)
Eficiencia	Equal variances assumed	0,970	0,330	1,596	42	0,118

Leyenda. Usando el programa estadístico SPSS, se determinó si existe una variación significativa en los promedios de eficiencia de la espermatogénesis entre los testículos derecho e izquierdo de los 4 animales utilizados en el estudio. Para esto se usó una prueba t de muestras independientes y se asumieron varianzas iguales.

Tabla 2. Resumen de resultados del modelo ANOVA usado para comparar la eficiencia entre bovinos.

ANOVA					
Eficiencia 2	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Gro ups	519,825	3	173,275	0,997	0,404
Within Gro ups	7301,432	42	173,844		
Total	7821,257	45			

Leyenda. Usando el programa estadístico SPSS, se determinó si existe una variación significativa en los promedios de eficiencia de la espermatogénesis entre los 4 animales usados en el estudio. Para esto se llevó a cabo un ANOVA con los resultados obtenidos en los conteos.

Tabla 3. Resumen de resultados del modelo ANOVA usado para comparar la eficiencia entre las 4 zonas testiculares.

ANOVA					
Eficiencia TI	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	690,990	3	230,330	2,279	0,121
Within Groups	1515,951	15	101,063		
Total	2206,940	18			

Leyenda. Usando el programa estadístico SPSS, se determinó si existe una variación significativa en los promedios de eficiencia de la espermatogénesis entre las 4 zonas testiculares analizadas en el estudio. Para esto se llevó a cabo un ANOVA con los resultados obtenidos en los conteos. Solamente se utiliza el testículo izquierdo, esto considerando que la biopsia se simuló únicamente en este en cada uno de los animales.

FIGURAS

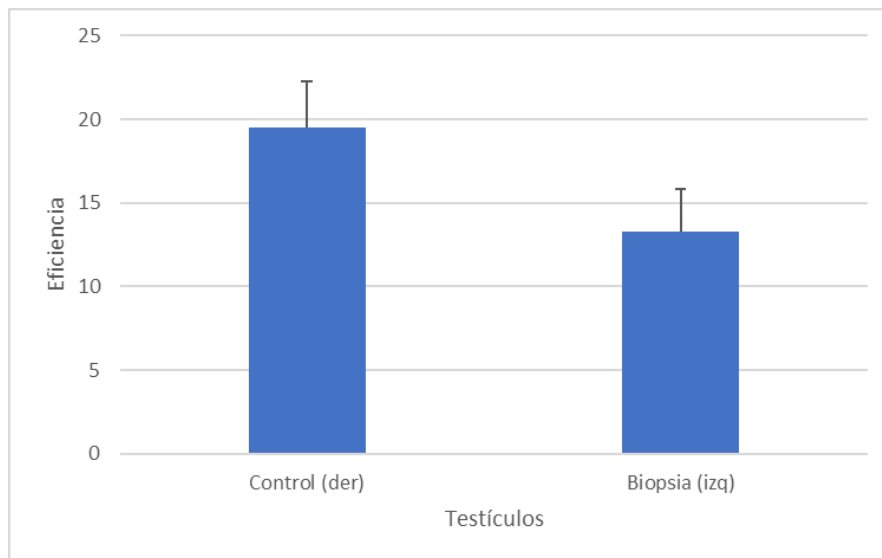


Figura 1. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre testículos derecho e izquierdo.

Leyenda. En el presente gráfico de cajas y bigotes se ilustra la variación en la eficiencia de la espermatogénesis entre ambos testículos para los 4 animales, medida en millones de células por gramo de tejido. El testículo derecho actúa como control considerando que la biopsia se simuló en el testículo izquierdo únicamente.

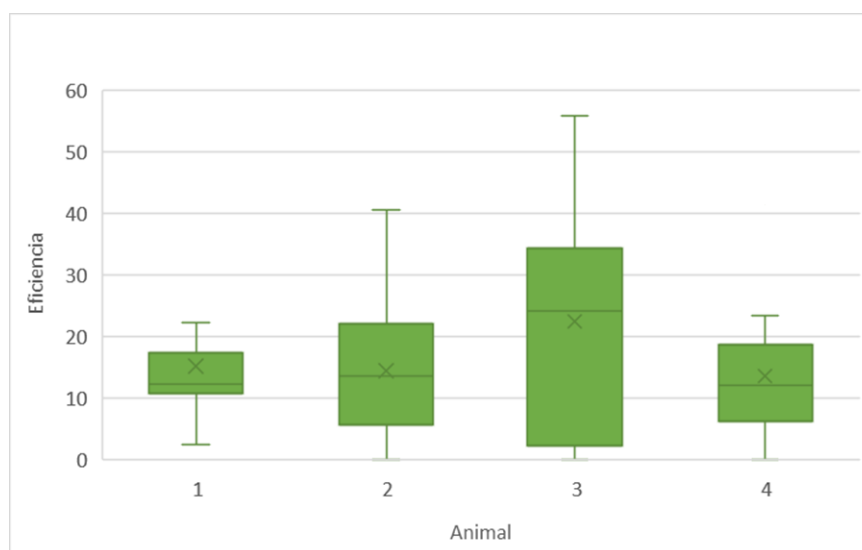


Figura 2. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre los 4 bovinos usados en el estudio.

Leyenda. En el presente gráfico de cajas y bigotes se ilustra la variación en la eficiencia de la espermatogénesis entre los 4 animales, medida en millones de células por gramo de tejido.

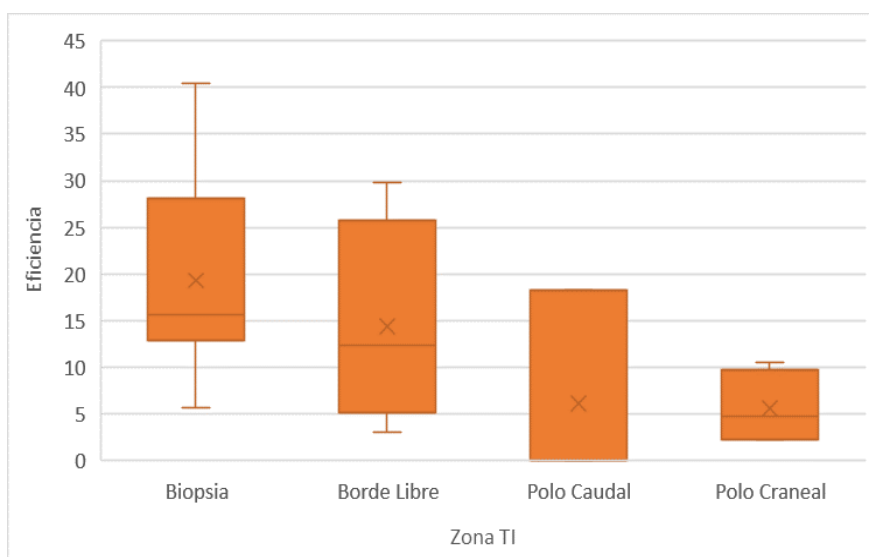


Figura 3. Comparación de medias de eficiencia de espermatogénesis entre las 4 zonas analizadas.

Leyenda. En el presente gráfico de cajas y bigotes se ilustra la variación en la eficiencia de la espermatogénesis entre las 4 zonas testiculares analizadas en el testículo izquierdo de los 4 animales, medida en millones de células por gramo de tejido. Solamente se utiliza el testículo izquierdo, esto considerando que la biopsia se simuló únicamente en este en cada uno de los animales.

REFERENCIAS

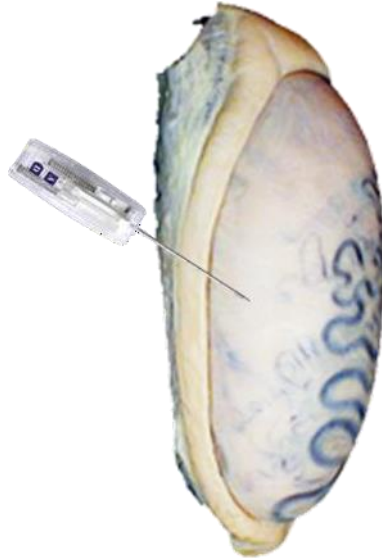
- Cleveland Clinic. (2022). *Cleveland Clinic*. Retrieved from Biopsy Overview:
<https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/15458-biopsy-overview>
- Crespilho, A. M., Ferreira, C. S., Bastos, Y. H., Guasti, P. N., Nascimento, J. C.,
 Guimarães, K. d., . . . Jr, K. d. (2019). *Scielo*. Retrieved from Testicular needle
 aspiration: Is it a safe method for breeding soundness evaluation in bulls?:
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0007>
- Gundersen, H. J. G., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L. X. M. N.,
 Marcussen, N., ... & West, M. J. (1988). The new stereological tools: disector,
 fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological
 research and diagnosis. *Apmis*, 96(7-12), 857-881.
- Heath, A. M., Carson, R. L., Purohit, R. C., Sartin, E. M., Wenzel, J. G., & Wolfe, D. F.
 (2002). Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *Journal of the
 American Veterinary Medical Association*, 220(4), 507-512.
- Jequier, A. M. (2011, 05 03). *Cambridge University Press*. Retrieved from Chapter 14 -
 Testicular biopsy: indications and complications:
[https://www.cambridge.org/core/books/abs/male-infertility/testicular-biopsy-
 indications-and-complications/F3729317A8B494EE96F4C7D649F77A6E](https://www.cambridge.org/core/books/abs/male-infertility/testicular-biopsy-indications-and-complications/F3729317A8B494EE96F4C7D649F77A6E)
- Johnson, L. (1995). *NIH*. Retrieved from Efficiency of spermatogenesis:
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070320504>
- Rajak, Dhyani, S. K., Kumaresan, A., Gaurav, K, M. A., Mohanty, T. K., . . .
 Venkatasubramanian, V. (2013, 07). *Indian Journal of Animal Sciences*.
 Retrieved from Testicular biometry and semen quality is not altered by the
 process of fine needle:
[https://www.researchgate.net/publication/265334776_Testicular_biometry_and_
 semen_quality_is_not_altered_by_the_process_of_fine_needle_aspiration_in_cr
 ossbred_bulls](https://www.researchgate.net/publication/265334776_Testicular_biometry_and_semen_quality_is_not_altered_by_the_process_of_fine_needle_aspiration_in_crossbred_bulls)
- Schlegel, P., & Su, L. (1997, 08 12). *Pubmed*. Retrieved from Physiological
 consequences of testicular sperm extraction.:
<https://doi.org/10.1093/humrep/12.8.1688>
- Shufaro, Y., Prus, D., Laufer, N., & Simon, A. (2022, 07 17). *Pubmed*. Retrieved
 from Impact of repeated testicular fine needle aspirations (TEFNA) and
 testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis:
 an animal model.: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.7.1795>
- Standford Medicine. (2021). *Standford Medicine Children´s Health*. Retrieved from
 Biopsia: [https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=biopsy-85-
 P04047](https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=biopsy-85-P04047)
- Staub, C., & Johnson, L. (2018, 03 13). *Elsevier*. Retrieved from Review:
 Spermatogenesis in the bull:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1751731118000435?token=D38C5AA8E7206FCD17848E83095154EE8D78EEE728952EB9C31E34B1BC806B9F3B9F8E222F6951C0414A470B93814C80&originRegion=us-east-1&originCreation=20221220230629>

Thomas, J. (2021, 09). *University of Missouri*. Retrieved from Reproductive Anatomy and Physiology of the Bull: <https://extension.missouri.edu/publications/g2016>

ANEXOS

ANEXO 1: SITIO DE SIMULACIÓN DE BIOPSIA.



ANEXO 2: EJEMPLO DE CONTEO DE ESPERMÁTIDAS REDONDAS.

