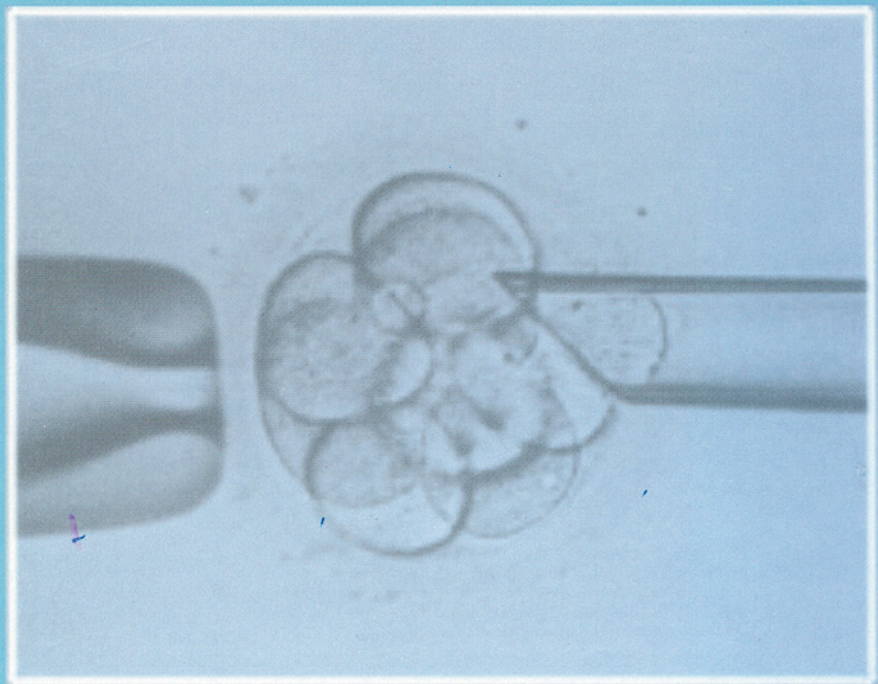


REPRODUCCIÓN HUMANA



**J. Remohí
A. Pellicer
C. Simón
J. Navarro**

2.^a edición

**Mc
Graw
Hill**



McGRAW-HILL • INTERAMERICANA

REPRODUCCIÓN HUMANA

2.^a edición

J. REMOHÍ

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia.
Departamento de Pediatría,
Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina Valencia (España)

A. PELLICER

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Valencia.
Departamento de Pediatría,
Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina Valencia (España)

C. SIMÓN

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Valencia.
Departamento de Pediatría,
Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina Valencia (España)
Fundación Instituto Valenciano de Infertilidad para el Estudio
de la Reproducción (FIVIER)

J. NAVARRO

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Sevilla (España)



McGRAW-HILL • INTERAMERICANA

MADRID • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA • LISBOA • MEXICO
NUEVA YORK • PANAMA • SAN JUAN • SANTAFE DE BOGOTA • SANTIAGO • SÃO PAULO
AUCKLAND • HAMBURGO • LONDRES • MILAN • MONTREAL • NUEVA DELHI • PARIS
SAN FRANCISCO • SYDNEY • SINGAPUR • ST. LOUIS • TOKIO • TORONTO

REPRODUCCIÓN HUMANA

No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright.

DERECHOS RESERVADOS © 2002, respecto de la segunda edición en español, por J. REMOHÍ y cols.

McGRAW-HILL - INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U.

Edificio Valrealty, 1.ª planta
Basauri, 17
28023 Aravaca (Madrid)

Primera edición: 1996

ISBN: 84-486-0462-8
Depósito legal: M. 30.917-2002

Preimpresión: MonoComp, S. A. Cartagena, 43. 28028 Madrid
Impreso en EDIGRAFOS, S. A. Volta, 2. Pol. Ind. San Marcos. 28906 Getafe (Madrid)

IMPRESO EN ESPAÑA - PRINTED IN SPAIN

EL USO DE LAS ESPERMÁTIDES EN LA AZOOSPERMIA

S. Silber

- TESE y la confusión acerca de las espermátides
- Distribución de la espermatogénesis
- Azoospermia obstructiva frente a azoospermia no obstructiva
- Población de pacientes y análisis histológicos
- Aspiración microquirúrgica de espermatozoides epididimarios (MESA)

- Técnicas para la biopsia testicular diagnóstica para el procedimiento de TESE testicular y para la disección del tejido testicular
- Observaciones en el TESE microquirúrgico
- Cartografiado histológico testicular
- Discusión y conclusiones
- Bibliografía

TESE Y LA CONFUSIÓN ACERCA DE LAS ESPERMÁTIDES

La extracción de espermatozoides testiculares (TESE) con inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) fue introducida por primera vez en 1993¹⁻⁴ para el tratamiento de la azoospermia obstructiva.

Inmediatamente después, esta técnica fue utilizada en varones azoospermicos con espermatogénesis deficiente, por ejemplo en los casos de azoospermia no obstructiva⁵⁻⁷. El término TESE-ICSI, tal y como se acuñó por primera vez en 1994, se ha convertido en el tratamiento habitual para los varones azoospermicos, aunque pocos embriólogos o clínicos tienen un claro conocimiento de él.

Las bases teóricas para intentar la recuperación de espermatozoides para ICSI a partir de los testículos de varones con una aparente ausencia de espermatogénesis se basó en los estudios histológicos cuantitativos iniciales de biopsias testiculares en varones fértiles e infértiles⁸⁻¹⁰. Aplicando la técnica TESE, originalmente desarrollada para la azoospermia obstructiva con espermatogénesis normal, se observó que incluso en los pacientes azoospermicos con una aparente ausencia de espermatogénesis, se encuentran frecuentemente focos puntuales de producción espermática en los testículos (Fig. 42.1). Los estudios originales de cuantificación de la espermatogénesis por histología demostraron un desconcertante número de pacientes en los que, a pesar de no presentar ningún espermatozoide en el eyaculado, se demostró la presencia de una media de una o dos espermátides por túbulo seminífero. Este hecho no se comentó en nuestros primeros artículos. De cualquier modo, ahora se sabe que una azoospermia absoluta en el eyaculado no representa una ausencia de producción de espermatozoides en los testículos. Un cierto umbral de producción de espermatozoides debe ser sobrepasado para que alguno de ellos pueda aparecer en el eyaculado. Así pues, nosotros hipotetizamos que podría existir un número muy bajo de espermatozoides en los tes-

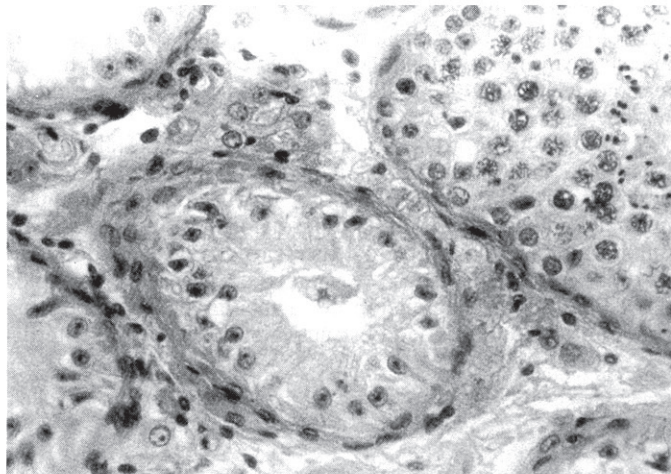


Figura 42.1. Sección histológica de una biopsia testicular en un paciente con «sólo células de Sertoli», FSH elevada y túbulos ocasionales con espermatogénesis normal. El túbulo situado en la parte superior derecha muestra una espermatogénesis normal, pero todos los demás túbulos tienen «sólo células de Sertoli». (De Silber SJ, Johnson L, Verheyen G, Van Steirterghem A. *Fertil Steril* 2000, 73:897-900).

tículos, y que éstos serían suficientes para un procedimiento de ICSI, incluso en los pacientes cuya azoospermia se debía aparentemente a una «ausencia» de espermatogénesis.

Esta observación nos condujo a realizar TESE con éxito en pacientes con azoospermias provocadas por el síndrome de «sólo células de Sertoli», o atrofia testicular por criptoorquidia, cuyos niveles de FSH eran elevados, los testículos presentaban un volumen disminuido y, sin embargo, tenían pequeños focos de espermatogénesis normal²⁻¹¹. Es obvio que, en los casos de «sólo células

de Sertoli» sin espermatogénesis, sería inútil buscar espermátides como solución al problema de no encontrar espermatozoides⁷ (Fig. 42.2).

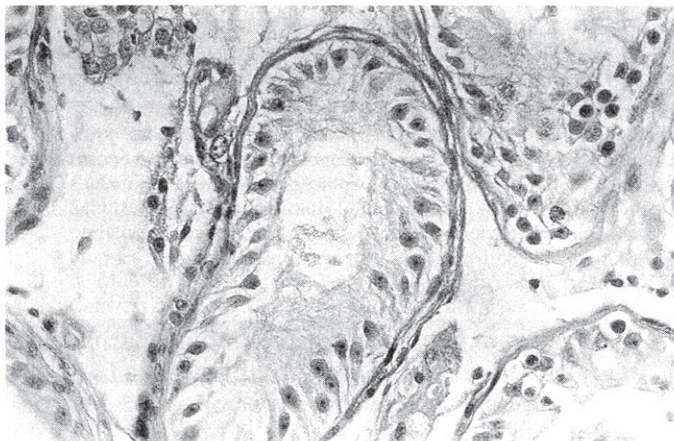


Figura 42.2. Secciones histológicas de testículos con tinción con hematoxilina/eosina que muestran síndrome de «sólo células de Sertoli» sin la presencia de células germinales. Las células de Sertoli son relativamente amorfas y ameboideas, sin límites diferentes, y su núcleo es redondo, cercano al tamaño de una espermátide, muy bien definido y con un nucléolo prominente de tinción oscura.

De forma ocasional, se encontraron espermátides maduras en la histología testicular de alrededor del 60 % de los pacientes azoospermicos no obstructivos, si el diagnóstico era de síndrome de «sólo células de Sertoli» o detención de maduración. Así, para que se alcance el eyaculado¹²⁻¹³ parece existir un cierto umbral mínimo de espermatogénesis en todos los tipos de azoospermia no obstructiva.

Quedaba por abordar el problema de la azoospermia no obstructiva causada por la detención de la maduración. La detención de la maduración se caracteriza por unos testículos de tamaño normal y etapas iniciales de la espermatogénesis normales, pero también por un fallo completo de la meiosis o división reduccional de espermatocitos en la fase de paquitene a espermátides haploides (Fig. 42.3). La detención de la maduración es una causa común de azoospermia no obstructiva en los pacientes estériles

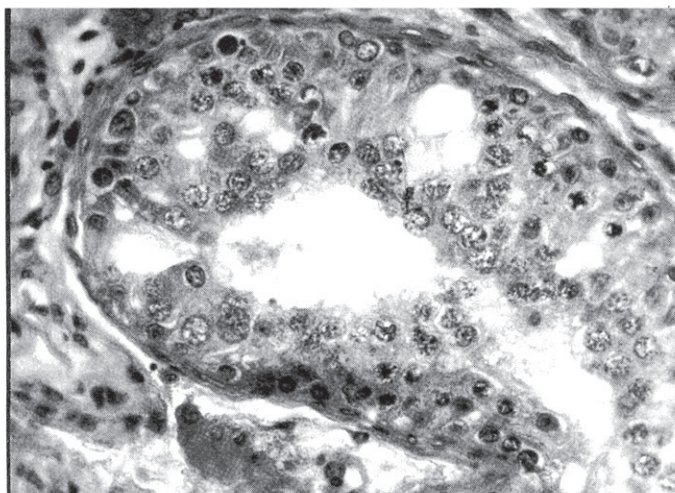


Figura 42.3. Sección histológica de tejidos con tinción de hematoxilina/eosina que muestran una detención de la maduración. Hay una progresión completa de espermatogonias y espermatocitos primarios, pero no pueden detectarse ni espermatocitos secundarios ni espermátides redondas.

con espermatogénesis deficiente. En los seres humanos, esta detención puede ser premeiótica o meiótica, por lo que rara vez pueden aparecer espermátides inmaduras haploides, salvo que también esté presente la característica aparición de espermátides más tardías y espermatozoides¹⁴⁻¹⁶.

Cuando los histólogos testiculares se han referido clásicamente a «espermátides maduras», «espermátides condensadas» o «espermátides elongadas», se están refiriendo a células germinales que parecen iguales a las que los embriólogos ven en una preparación húmeda de tejido testicular dislacerado^{8-10, 17}.

En una sección fina, teñida, de tejido testicular (5 μ m); las (por comparación) grandes cabezas espermáticas son fácilmente visibles, pero las colas espermáticas frecuentemente se pierden por la sección, por lo que no se ven. Sin embargo, los histólogos saben que las cabezas se encuentran allí (Fig. 42.4A, B y C); tan sólo que normalmente no se observan en cortes finos. Cuando se observan, ocasionalmente, en la tinción con hematoxilina/eosina, presentan un rojo pálido.

Así pues, la única razón por la que una espermátide madura puede ser llamada «espermátide», en lugar de «espermatozoide», es porque todavía se observan entre el citoplasma de las células de Sertoli. Una vez se han extraído de este tejido testicular, no parecen diferentes a un espermatozoide, excepto por el hecho de que, en la histología, las denominamos espermátides maduras porque: 1) están en el citoplasma de las células de Sertoli, y 2) sólo la cabeza puede ser observada en el corte histológico^{14-16, 18}.

El hallazgo de espermátides maduras en un número reducido de estos varones azoospermicos alcanzó, finalmente, una aplicación clínica práctica con el desarrollo del ICSI¹⁹⁻²⁰. La técnica del TESE-ICSI tuvo éxito en el 60 % de los pacientes con azoospermia, causada bien por «detención de la maduración», bien por «sólo células de Sertoli». Las espermátides redondas nunca se uti-

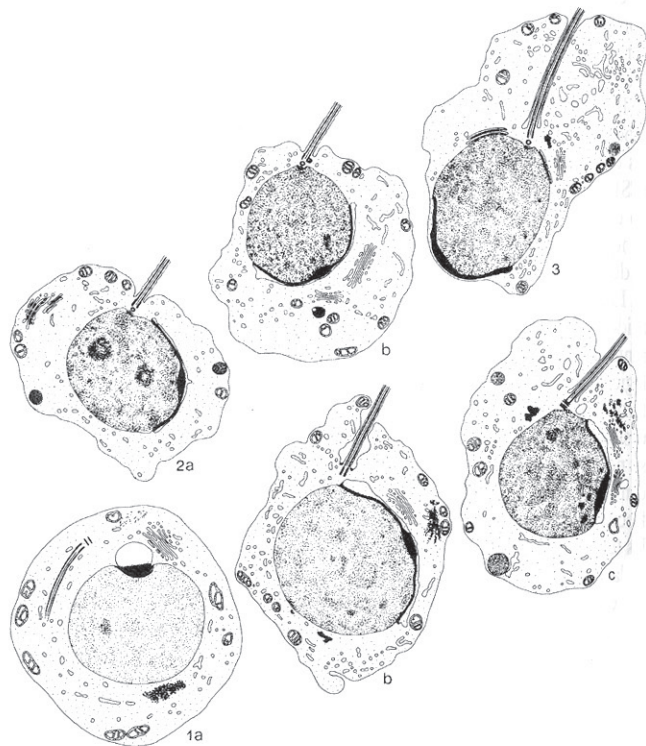


Figura 42.4A. Dibujos de las etapas de la espermatogénesis tras la segunda división meiótica. Antes de la formación de la cola, la espermátide redonda puede ser siempre reconocida por la prominente vesícula acrosómica (1A). A medida que la vesícula acrosómica remite, la cola empieza a formarse. (De Holstein AF, Roosen-Runge ED, editores. *Atlas de espermatogénesis humana*. Berlín, Grosse Verlag, 1981).

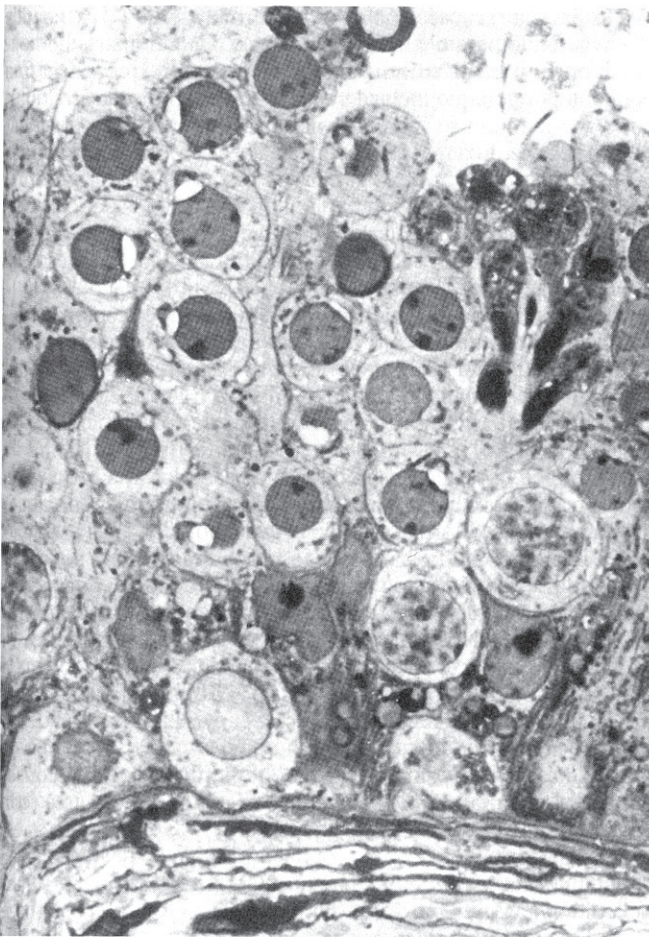


Figura 42.4B. Micrografía electrónica de una sección de la espermatogénesis humana, que muestra espermatozonias tipo A pálidas, núcleos de células de Sertoli, espermatozonios en paquitene, espermátides redondas tempranas con vesícula acrosomal y espermátides maduras, con una cabeza oval y de tinción oscura (De Holstein AF, Roosen-Runge ED, editores. *Atlas de espermatogénesis humana*. Berlín, Grosse Verlag, 1981).

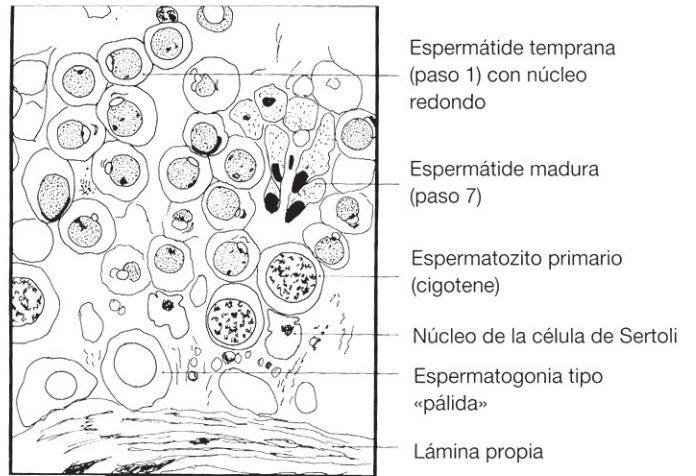


Figura 42.4C. Diagrama representativo de la Figura 42.4B, con el etiquetado de las células específicas implicadas en la espermatogénesis. (De Holstein AF, Roosen-Runge ED, editores. *Atlas de espermatogénesis humana*. Berlín, Grosse Verlag, 1981).

Biopsia testicular cuantitativa y de espermatozoides

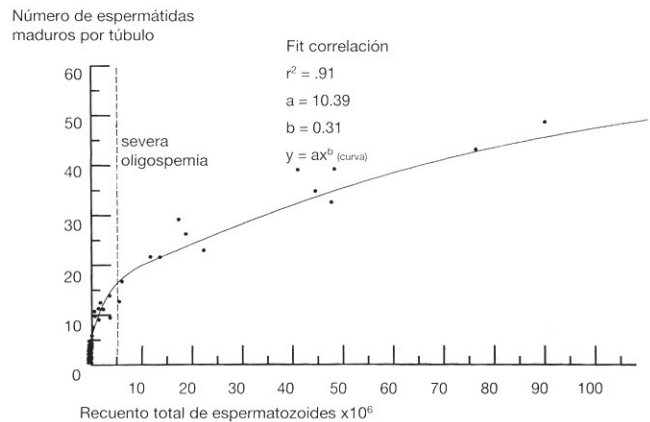


Figura 42.5. Curva exponencial que relaciona el recuento espermático en el eyaculado con la media de espermátides maduras por túbulo en cada túbulo seminífero. Debe superarse un umbral de tres espermátides maduras por túbulo para que aparezcan espermatozoides en el eyaculado. (De Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testes of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod*, 1997, 12: 2422-2428).

lizaron; en el ICSI sólo se usaron espermátides maduras y espermatozoides. En estas muestras testiculares de TESE siempre hubo abundancia de «células redondas», pero no se observaron nunca espermátides maduras, a menos que también se hallaran espermátides elongadas y con cola. La detención de la maduración fue siempre meiótica o premeiótica.

DISTRIBUCIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

En las primeras series, no se realizó ningún intento de cartografiar los lugares de espermatogénesis, incluso tomando frecuentemente cantidades importantes de tejido testicular^{12, 21-22}.

Estudios histológicos cuantitativos en pacientes sometidos a TESE han confirmado que existe una cantidad umbral de espermatogénesis que debe ser sobrepasada para que el espermatozoides «derrame» en el eyaculado¹³ (Fig. 42.5). Los varones con azoospermia no obstructiva causada por un fallo germinal tienen una media de entre 0 a 3 espermátides maduras por túbulo seminífero, en contraste con las 17-35 espermátides maduras por túbulo presentes en los varones con espermatogénesis normal y azoospermia obstructiva²³. El primero representó el umbral cuantitativo de espermatogénesis que debe ser superado para que los espermatozoides aparezcan en el eyaculado. El cartografiado testicular mediante biopsia múltiple, así como la extracción mediante micro-

cirugía de pequeñas bandas contiguas de tejido testicular, revelan una distribución difusa, más que regional, de estos mínimos focos espermatogénicos. Esto es cierto si la afección presente es el síndrome de «sólo células de Sertoli» o una detención de la maduración. En el primero, hay pequeños islotes de espermatogénesis normal con espermátides maduras en el «mar» de células de Sertoli vacías¹⁸⁻²⁴; en el segundo, estos pequeños islotes se encuentran en el mar de túbulos con detención de maduración en la meiosis.

Como un diagnóstico histológico previo de la biopsia testicular (realizado aleatoriamente en cualquier punto de la superficie testicular) predecía habitualmente el éxito o el fallo del TESE, dedujimos, en un principio, que la espermatogénesis es difusa en esos casos en lugar de regional¹³. Un resultado positivo de la biopsia siempre dio un TESE positivo; sin embargo, en el 15 % de los casos una biopsia aleatoria negativa no era capaz de predecir un fallo al buscar espermatozoides con TESE.

De cualquier modo, con frecuencia se realizan biopsias múltiples amplias de cada área de los testículos, en un esfuerzo por encontrar suficientes espermatozoides para TESE^{12, 21-22}. Esto puede causar un gran daño testicular, e incluso podría limitar los pacientes «con éxito» en un solo intento^(32a, 32b). La lesión es, en determinadas ocasiones, minimizada con el uso de una aguja, en lugar de realizar una biopsia abierta, para encontrar espermatozoides para ICSI²⁶. Así pues, estudios controlados han demostrado que para los casos difíciles con azoospermia no obstructiva, en los que la espermatogénesis es exigua, es mucho menos probable encontrar los focos de espermatogénesis para ICSI mediante la biopsia con agujas que con la biopsia testicular abierta²⁷⁻²⁹.

Friedler³⁰ argumentó que en la azoospermia no obstructiva «el factor principal para determinar el éxito en esta situación clínica es la cantidad de tejido testicular examinado». No tenemos duda de que la biopsia abierta nos permite conseguir y examinar más tejido que la aspiración con aguja³⁰. En la azoospermia no obstructiva³⁰ se ha demostrado una mejora espectacular de las tasas de éxito utilizando la biopsia abierta frente a la biopsia con aguja en TESE-ICSI. En el 14 % de los pacientes en los que se realizó aspiración mediante aguja, se tuvo éxito en la recuperación de espermatozoides, frente a un 63 % de los pacientes en los que se realizó biopsia abierta. En ambos casos, se argumentó que sólo es posible una alta tasa de éxito con la biopsia con aguja en los casos de azoospermia obstructiva: «La biopsia testicular abierta es más efectiva que la aspiración con aguja... en los pacientes azoospermicos con defectos en la espermatogénesis. La diferencia observada puede estar relacionada con la cantidad de tejido obtenida»²⁹.

Otros autores observaron que no había una región o localización particular en los testículos en la que existiera una mayor posibilidad de encontrar espermatozoides, y recomendaron realizar un muestreo testicular múltiple, en lugar de una biopsia simple, dándose cuenta de que frecuentemente los espermatozoides se encontraban en una muestra de biopsia, pero no en otra³¹. Nosotros demostramos claramente que la distribución era fundamentalmente difusa, y que no existía ningún patrón ni distribución regional de la espermatogénesis en estos testículos deficientes, lo que apoyaba las aproximaciones anteriormente descritas^{13, 18}. De acuerdo con este punto de vista, la cantidad total de tejido tomado (tal y como Friedler argumenta) es el determinante final del éxito del TESE. Ésta es la razón por la que una minúscula biopsia con aguja tiene una escasa probabilidad de ser capaz de pronosticar si se podrían encontrar espermatozoides en un muestreo más amplio con TESE.

De cualquier forma, nuestra meta final sería la reducción de la cantidad de tejido testicular a tomar, en lugar de aumentarlo. Por esta razón, se necesitó examinar de nuevo cuidadosamente nuestro enfoque antes de TESE, empleando una inspección microquirúrgica directa. Se ha observado²⁵ que con frecuencia los escasos focos de espermatogénesis normal podrían detectarse directamente con el microscopio y, de esta manera, en algunos casos tan sólo necesitarían ser extraídas pequeñas porciones de testículo. Con ello, un conocimiento directo (en lugar de una presunción indirecta) de la histología, la anatomía, la cinética y la distribución de la espermatogénesis, así como el uso de técnicas microquirúrgicas, se beneficiará claramente de los esfuerzos para recuperar espermatozoides en la azoospermia no obstructiva.

AZOOSPERMIA OBSTRUCTIVA FRENTE A AZOOSPERMIA NO OBSTRUCTIVA

La mayor parte de los centros de fecundación *in vitro* (FIV) no se preocupan de la diferenciación entre «azoospermia obstructiva» y los diferentes tipos de «azoospermia no obstructiva», términos que nosotros acuñamos inicialmente cuando desarrollamos el concepto de TESE (término también acuñado por nosotros un año antes)^{4, 6, 11}. De manera sistemática, en bastantes centros, un paciente azoospermico es sometido a biopsia testicular mediante

agujas para la recuperación de los espermatozoides, y casi nunca se envía tejido para el análisis histológico. Cuando parte del tejido se envía para su estudio histológico, es con frecuencia una pequeña porción que incluye pocas secciones transversales tubulares, y a menudo se fija en formalina, lo que la hace prácticamente ilegible. Los médicos de FIV y los embriólogos casi nunca miran la histología, y confían para su diagnóstico en el informe del anatomopatólogo, quien frecuentemente sólo dispone de cortes inadecuados para evaluar, y están generalmente más preocupados en descartar un cáncer que en los intrincados detalles de la espermatogénesis^{8, 10, 12, 17}.

Hemos estudiado la cinética y la histología de la espermatogénesis cuantitativamente en todas las variedades de azoospermia con biopsia abierta múltiple, biopsia con aguja múltiple y, finalmente, con el examen de grandes bandas contiguas de tejido testicular representando el diámetro entero de los testículos^{18, 23}. Según todo esto, es evidente que cualquier tipo de sistema de recuperación espermática (aguja o biopsia abierta) sirve para la azoospermia obstructiva, en la que siempre hay una espermatogénesis abundante y normal en todo el testículo.

De cualquier modo, para la azoospermia obstructiva tiene más sentido la recuperación de espermatozoides del epidídimo proximal, ya que estos espermatozoides presentan una mayor movilidad y son fáciles de congelar sin ningún procesamiento previo. Más aún, sin esfuerzo en el laboratorio pueden ser utilizados en un número ilimitado de procedimientos de ICSI, con una tasa de gestación no inferior a la conseguida con el eyaculado fresco de un donante normal^{2-4, 6}.

Además, los espermatozoides del epidídimo pueden conseguirse de una manera *menos dolorosa* que los testiculares (con cualquiera de los dos métodos, biopsia abierta o aguja), con anestesia local²⁴.

La única razón, por tanto, para usar esperma testicular en lugar del epididimario, en los casos «simples» de azoospermia obstructiva, es la falta de habilidad por parte del urólogo, o incluso no consultar a uno.

La azoospermia no obstructiva, definida por la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, sin obstrucción de los conductos, es más compleja, y ésta es la confusión que ha surgido sobre la «obtención de espermátides». En la azoospermia obstructiva siempre se encuentra una media de 17 a 35 espermátides maduras por sección transversal histológica de cada túbulo seminífero^{8, 23}. Como en todos los varones con espermatogénesis normal, algunos túbulos tienen pocas espermátides maduras, mientras que otros tienen más de 35. Esto representa exactamente el difuso mosaico de las etapas de la espermatogénesis en los testículos humanos¹⁷. Pero si se cuenta el número de espermátides maduras y se divide entre el total de túbulos por corte, el resultado *siempre* es mayor de 17 en la azoospermia obstructiva y, en cualquier pequeña porción, sin importar su tamaño (excepto puede que en casos muy raros en los que un varón con oligospermia grave haya sido sometido a una vasectomía o una ligadura accidental de su conducto durante una herniorrafia en la infancia).

La azoospermia no obstructiva es la que mayores controversias ha provocado. Nuestros estudios microquirúrgicos e histológicos cuantitativos fueron realizados para erradicar tal confusión.

POBLACIÓN DE PACIENTES Y ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Los pacientes con azoospermia no obstructiva fueron definidos del siguiente modo.

En todos los pacientes, el semen azoospermico fue sometido en tres ocasiones diferentes a una centrifugación a 1800 o con un cuidadoso y prolongado examen, en busca de la presencia de algún espermatozoide. Si se detectaron suficientes espermatozoides para ICSI, estos pacientes fueron excluidos del estudio y se realizaron en ellos procedimientos de ICSI habituales, utilizando el semen eyaculado, incluyéndose en la categoría de «pseudo-azoos-

permia». La ausencia de obstrucción en la vía fue verificada en todos los pacientes en el momento de la biopsia diagnóstica, o en el del TESE por observación directa. El diagnóstico de fallo testicular se basó en el hallazgo de azoospermia, la ausencia de obstrucción y la histología.

Las cuestiones más importantes a determinar fueron: (1) si la distribución de los focos espermatogénicos era difusa o regional; y (2) si el TESE microquirúrgico podría causar menos lesión que el TESE convencional; si permitiría la obtención de mayores cantidades de tejido testicular, si fuera necesario; y si preservaría el potencial para futuros procedimientos con TESE.

El método del análisis cuantitativo de la histología testicular ya se ha descrito anteriormente^{8-10, 13, 23}. Las secciones histológicas fueron cuidadosamente preparadas desde el principio, escindiendo los microtúbulos con microtijeras Iris húmedas y afiladas, utilizando un método «sin contacto» y dejándolas caer en una solución de Zenker sin ser manipuladas. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina, y cortadas en secciones delgadas. La biopsia no fue considerada válida si al menos 20 túbulos seminíferos no se pudieron evaluar¹⁰. Se evaluaron todos los pasos de la espermatogénesis, desde espermatogonia a espermatocito en reposo, leptotene, cigotene, paquitene, espermátides inmaduras (S-A y S-B) y espermátides maduras (S-C y S-D). El número de células de Sertoli no se contó sistemáticamente, ya que estudios previos han demostrado que existe una gran variabilidad en el número y no es un dato útil para utilizar como guía.

El síndrome de «sólo células de Sertoli» fue definido como la biopsia en la que existen predominantemente túbulos seminíferos sólo con células de Sertoli y sin espermatogénesis. Un túbulo aislado con espermatogénesis en un campo con túbulos estrictamente «sólo Sertoli» se definieron también como «sólo Sertoli» con espermatogénesis focal. La detención de la maduración se definió como una ausencia aparente de cualquier espermátide madura junto a estadios normales previos de la espermatogénesis. La presencia ocasional de espermátides maduras en preparaciones enteras de detención de la maduración no cambió en general su diagnóstico. Una biopsia que mostraba túbulos aislados con pocas espermátides en un campo con túbulos que de otro modo eran estrictamente «sólo Sertoli», se definió, por simplificar, también como «sólo Sertoli». La detención de la maduración se definió como la ausencia de espermátides maduras a pesar de haber fases iniciales de la espermatogénesis normales. La presencia de espermátides maduras ocasionales en muestras que de otro modo eran de detención total de la maduración, se siguió definiendo igual.

En ninguno de nuestros casos de detención de la maduración en seres humanos, examinados cuantitativamente, encontramos una «detención en espermátides»; la detención en el desarrollo espermático fue siempre en meiosis. El espermatozoide maduro de morfología anormal no se determinó como detención en la maduración, basándose en todos los amplios estudios de microscopía electrónica de Holstein.³³⁻³⁴

En todos los casos de detención de la maduración examinados en este estudio definidos como azoospermia, ausencia de obstrucción y presencia solamente de etapas tempranas de la espermatogénesis a lo largo de la biopsia testicular con testículos de tamaño normal y niveles de FSH normales, el bloqueo en la espermatogénesis fue a nivel de espermatocito en paquitene. En cualquiera de estos pacientes la primera división meiótica no era completa en la inmensa mayoría de los túbulos. De cualquier forma, una exhaustiva búsqueda con frecuencia reveló la presencia de espermátides redondas y alargadas ocasionales. No se observó ningún signo de que las células redondas fallaran en el desarrollo en la espermiogénesis hacia las espermátides elongadas, maduras y espermatozoides. Cuando se detectaron, ocasionalmente, en una preparación, células redondas en áreas focales de detención de la maduración, también se detectaron espermátides maduras alargadas.

Así pues, el fenómeno de detención de la maduración parece producirse inmediatamente antes de completar la primera división meiótica a nivel de espermatocito en paquitene. No parecía existir

problema alguno en el desarrollo de la célula haploide de espermátide redonda a elongada; el único problema con la maduración fue en fallos de meiosis.

Debe aclararse que una espermátide se define como cualquier célula haploide que todavía está contenida en una célula de Sertoli. Las espermátides elongadas, obviamente tienen un aspecto que no es diferente del de los espermatozoides, salvo en que las primeras todavía no han sido liberadas. El esperma liberado y las colas de los espermatozoides suelen no poder verse en la histología testicular.

Ha existido una gran confusión generada por el uso de expresiones tales como «espermátides maduras por túbulo»^{7, 12-13}. A lo que el anatomopatólogo se refiere, en una extensión histológica, como «espermátide madura» son, de hecho, lo que al embriólogo le sugiere en el TESE que es un espermatozoide. En una sección histológica, la cola del espermatozoide es difícilmente visible, y en cortes tan finos sólo puede verse la mayor parte de la cabeza. Pero no es un espermatozoide sin cola; lo que ocurre es que en la histología sólo se puede observar la cabeza sin cola.

Por el mismo motivo, lo que aparecería como un «espermatozoide» en TESE, en la histología, suele observarse entre el citoplasma de las células de Sertoli y, por definición, es una «espermátide» madura (por espermátide madura no queremos decir una «espermátide redonda»). La solución para los casos en los que no se distinguen espermatozoides en el TESE no consiste en buscar células redondas en la preparación en fresco^{15, 16}. Cuando nos referimos en la histología a «espermátides maduras por túbulo», queremos decir células que aparecen en el TESE como simples espermatozoides.

ASPIRACIÓN MICROQUIRÚRGICA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS (MESA)

Los varones con azoospermia obstructiva son sometidos a una simple exploración escrotal usando anestesia local. Utilizando entre 10 y 40x aumentos en un microscopio, se realiza una incisión de 0.5 cm con las microtijeras en la túnica epididimaria para exponer los túbulos de la porción más proximal del epidídimo obstruido³⁵.

Los espermatozoides son aspirados con una micropipeta (0.7 mm/22 mm; Cook Urological, Spencer, IN) en una jeringa de tuberculina, directamente desde la apertura del túbulo del epidídimo. Las muestras son inmediatamente diluidas en medio de Earle's tamponado con HEPES, y una mínima porción es examinada para el estudio de la movilidad y la calidad de la progresión. Los espermatozoides móviles a menudo se obtienen de la porción más proximal de la cabeza del epidídimo o los vasos eferentes. Una vez que se encuentra el área de los espermatozoides móviles, se usa una alícuota de líquido del epidídimo para ICSI y el resto se congela.

El estado actual de la situación parece ser que prácticamente no hay casos de azoospermia obstructiva que no puedan tratarse con métodos de recuperación de espermatozoides e ICSI, al menos si la mujer no tiene ella misma problemas irresolubles. En el caso de la azoospermia obstructiva, preferimos utilizar espermatozoides epididimarios, aunque el espermatozoide testicular funciona igualmente bien. La ventaja de usar espermatozoides epididimarios como primera opción es que se congelan con menor dificultad y representa una muestra de esperma simple, limpia, fácil y casi indefinida para el laboratorio, de ese paciente en particular, sin ninguna necesidad de futuros procedimientos cruentos, y sin necesidad, además, de disección ni procesamiento del tejido testicular³⁻⁵.

Se han producido bastantes debates acerca de la mejor manera de obtener espermatozoides epididimarios o testiculares de pacientes con azoospermia obstructiva para ICSI. El lector puede decidir que podría funcionar mejor en su propio ambiente concreto, pero en los siguientes párrafos se describen nuestras preferencias.

En la azoospermia obstructiva suele haber algo de epidídimo independientemente de la gravedad del defecto congénito. En esos casos, preferimos la microcirugía para la aspiración epididimaria (MESA) (Fig. 42.6). Realizamos toda la recuperación de espermatozoides utilizando anestesia local sin sedación. La obtención cuidadosa mediante microcirugía es un procedimiento que no requiere hospitalización y en el que los problemas posquirúrgicos son mínimos.

El urólogo sujeta el cordón espermático entre el pulgar y el índice, de un modo semejante a la realización de una vasectomía. El cordón es entonces infiltrado con varios mL de marcaína al 0.5%, lo que produce la anestesia testicular, pero no la del escroto. A continuación, se usan varios mL de marcaína al 0.5% para infiltrar la piel escrotal anterior con una aguja del calibre 25 a lo largo de una línea de incisión de 1 cm. Una vez llega a la *tunica vaginalis*, el epidídimo y el testículo se exponen en el campo de un microscopio. El paciente, además, puede ver el procedimiento entero en un monitor y debería estar perfectamente despierto y confortable.

La ventaja de la recuperación de los espermatozoides epididimarios de este modo es el gran número de espermatozoides más móviles que pueden obtenerse del conducto más proximal, que además pueden congelarse para un número ilimitado de futuros ciclos de ICSI. A menudo sólo existe una área específica del epidídimo proximal de la que se pueden recuperar espermatozoides móviles, que puede encontrarse más fácilmente gracias a la microcirugía que con una aguja y en ciego (lo cual, en verdad, es más doloroso que la MESA).

En la azoospermia no obstructiva nunca pueden hallarse espermatozoides epididimarios porque las paredes tubulares del epidídimo están colapsadas y no hay obstrucción que permita una recogida de espermatozoides. De cualquier modo, en la azoospermia no obstructiva todavía puede llevarse a cabo una biopsia testicular abierta, utilizando el microscopio, con el mismo tipo de anestesia local, con el paciente despierto, y con el menor trauma postoperatorio.

TÉCNICAS PARA LA BIOPSIA TESTICULAR DIAGNÓSTICA, PARA EL PROCEDIMIENTO DE TESE TESTICULAR Y PARA LA DISECCIÓN DEL TEJIDO TESTICULAR

La técnica para la biopsia testicular diagnóstica^{8, 18, 24} es muy simple en comparación con las utilizadas para TESE con ICSI. En la biopsia testicular diagnóstica, el cordón espermático es inyectado con unos 5 mL de marcaína (bupivacaína) al 0.25% mediante una aguja del calibre 27, distal al anillo inguinal externo. Se inyectan 2 mL adicionales del anestésico local al 0.25% sobre la piel escrotal anterior, en la zona donde se realizará una incisión de 0.5 cm a lo largo de la túnica albugínea. Se extrae una pequeña pieza de medio centímetro de tejido y se coloca en un medio de fijación de Zenker, utilizando una técnica atraumática «sin tocar». Éste es un procedimiento clínico que casi no causa dolor (exceptuando el inicial de la inyección de la anestesia). El paciente es capaz de levantarse y caminar inmediatamente después. Aunque el procedimiento no es más doloroso que una biopsia con aguja, siempre proporciona un número suficiente de túbulos (más de 20 preparaciones) seminíferos para realizar un análisis cuantitativo adecuado.

La técnica de TESE con ICSI en los casos iniciales de azoospermia no obstructiva se ha descrito anteriormente de manera muy detallada¹². El enfoque actual incluye la microcirugía y es mucho más fácil. Todos los casos microquirúrgicos fueron llevados a cabo sólo con anestesia local, como la descrita en la biopsia testicular diagnóstica. La *tunica vaginalis* se abre y se exterioriza el testículo. El microscopio se utiliza con unos aumentos de 16 a 40x durante el resto de la operación.

Con la extracción de una tira contigua de tejido testicular, se abre ampliamente la *tunica albugínea* en el borde «antimesentéri-

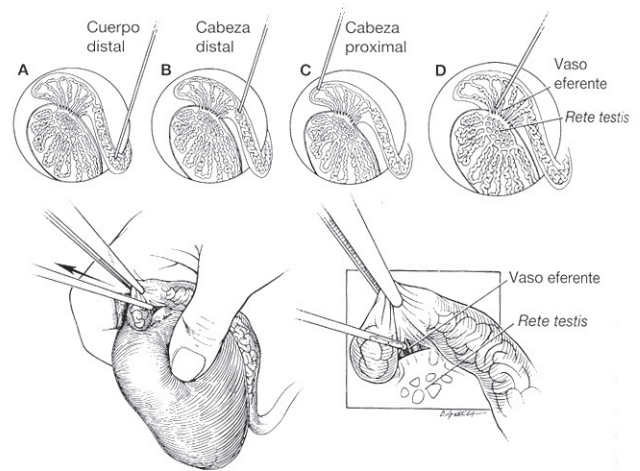


Figura 42.6. Diagrama de una aspiración microquirúrgica de espermatozoides epididimarios (MESA), empezando por el cuerpo distal (A) y desplazándose proximalmente hasta la cabeza proximal y los vasos eferentes (B, C, y D). En la azoospermia obstructiva hay una inversión de la localización fisiológica habitual de la mayor y menor movilidad. (De Silber SJ *et al.*, Congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*, 1990, 323: 1788-1792).

co», para que permita una visualización de los túbulos testiculares a 16 ó 40 aumentos¹⁸ (Fig. 42.7). Primero se realiza un intento de recuperar los microtúbulos que aparezcan dilatados y más opacos, y luego se escinden tiras largas de tejido (no mayores del total de las que hubieran sido tomadas con una antigua TESE «ciega»), si es necesario. En todos los casos microquirúrgicos, si las tiras eran continuas o se realizó una biopsia múltiple aleatoria con cartografiado, se utilizó la histología cuantitativa para cartografiar y comparar con la observación microquirúrgica (Fig. 42.8A, B y C). Todos los TESE microquirúrgicos se cerraron con suturas interrumpidas de nailon de 0-9, tras una hemostasia cuidadosa con fórceps microbipolar (Fig. 42.9). Esto evita cualquier incremento de la presión intratesticular, provocando un *mínimo dolor* y sin la *subsiguiente atrofia testicular*.

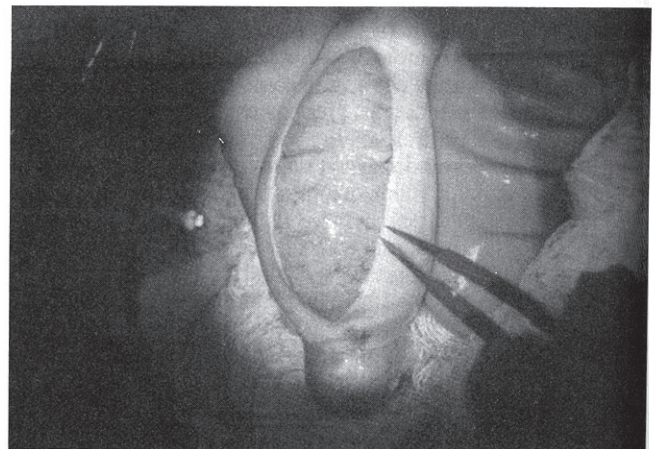


Figura 42.7. Una única y gran incisión para TESE en el microscopio produce un mínimo o nulo daño testicular y postintervención, así como capacidad para analizar cada túbulo seminífero en busca de la presencia de espermátogénesis. (De: Silber SJ. Microsurgical testicular sperm extraction and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 2000, 15: 2278-2288).

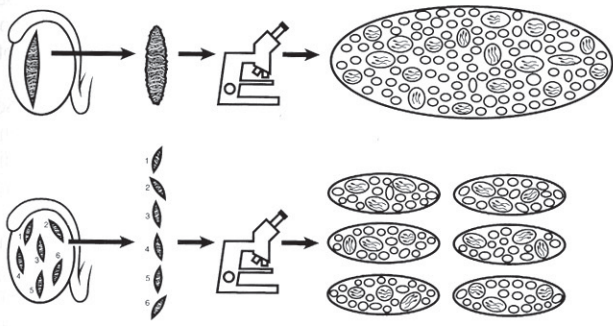


Figura 42.8A. Diagrama del método de cartografiado testicular, caso de «sólo células de Sertoli». En la parte superior de las figuras se puede ver la observación microquirúrgica e histológica de una preparación grande y contigua de tejido testicular. En la parte inferior, se ilustra un estudio similar de biopsias múltiples discontinuas. En el síndrome de «sólo células de Sertoli», sólo los túbulos mayores contienen espermatozoides, siendo los túbulos sin espermatozoides mucho más delgados.

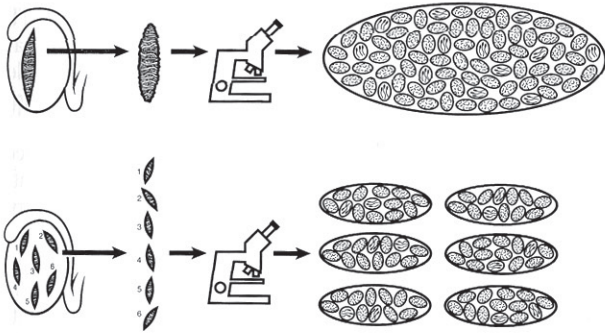


Figura 42.8B. Diagrama del método de un cartografiado testicular similar a la Figura 42.1, pero representando una detención de la maduración. En este caso, los túbulos seminíferos de un tamaño similar pueden tener o no espermatozoides.

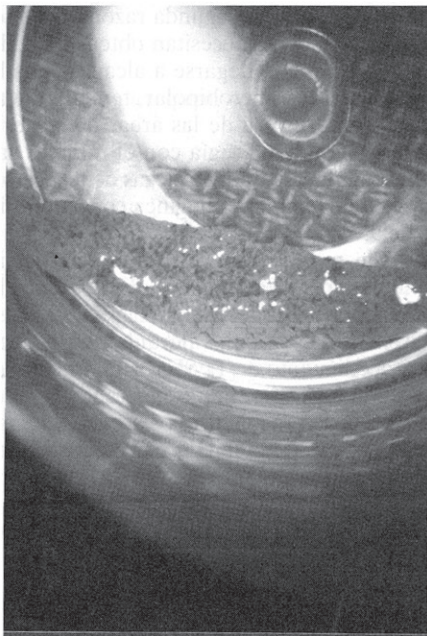


Figura 42.8C. Tira larga de tejido testicular que permite el estudio de un segmento testicular entero.

Aunque parezcan simples, existen algunos puntos técnicos importantes que incrementarán la obtención de espermatozoides y disminuirán el tiempo de laboratorio requerido en el TESE.

El procedimiento podría facilitarse de manera importante y proporcionar más éxito con la aplicación de dos pequeñas sugerencias. Primero, el tejido no debe ser diseccionado entre dos portaobjetos de vidrio dentro de una placa de Petri; este método es extremadamente grosero y produce un escado vaciado de los microtúbulos seminíferos. El uso de agujas del calibre 28 unidas a una jeringa de insulina es lo que nosotros recomendamos, pero la mayoría de los embriólogos realizan esta técnica de una forma demasiado laboriosa y se pierde mucho tiempo.

En lugar de utilizar las puntas de las agujas para separar los túbulos seminíferos, lo que es verdaderamente laborioso, las agujas deben estar dobladas en la zona del eje proximal en un ángulo aproximado de 60°, de manera que las propias agujas están situadas paralelas a la superficie de la placa de Petri. Los ejes de estas agujas del 28, paralelas a la superficie de la placa de Petri, pueden, fácilmente y de forma rápida, derramar los contenidos completos de los túbulos seminíferos. Esta forma de trabajar funciona absolutamente igual que la disección enzimática, y tan sólo requiere unos minutos.

Se extrae el sobrenadante, y el *pellet* es resuspendido en 50 μ L. Aquí es donde interviene el segundo consejo para que tenga lugar una obtención más rápida y eficaz de los espermatozoides en el laboratorio.

En primer lugar, se elimina el sobrenadante. Entonces, el *pellet* de tejido residual debe ser absorbido por la pared del tubo de la centrifuga con una pipeta Pasteur, dejando que el líquido drene por él hasta el fondo del tubo. Sólo tras este truco se aspira el total de los contenidos del fondo del tubo de la centrifuga en la pipeta.

En los casos muy complicados, la suspensión testicular puede ser incubada en algún agente que produzca la lisis de los hematíes y lavada de nuevo en un medio amortiguado con HEPES³⁶⁻³⁷; esto rara vez es necesario. Toda la suspensión es examinada completamente, dividiéndola en múltiples microgotas en la placa de inyección de ICSI, cada una con un volumen de 5 μ L. De esta forma se examina el efluente entero obtenido tras la rotura del tejido, frecuentemente tras varias horas, en un intento de encontrar espermatozoides¹²⁻¹⁸.

OBSERVACIONES EN EL TESE MICROQUIRÚRGICO

El síndrome de «sólo Sertoli» y la detención de la maduración fueron las dos categorías histológicas principales encontradas en los pacientes con azoospermia no obstructiva. La hipospermatogénesis siempre está asociada con el descubrimiento de algunos espermatozoides en el eyaculado, porque en estos casos siempre hay más de tres espermátides maduras por túbulo. En los casos de detención de la maduración, los túbulos mostraron unas características uniformes en cuanto a tamaño y opacidad. En la detención de la maduración es imposible, incluso con el microscopio, distinguir los pocos túbulos con maduración completa hasta espermatozoides de los que carecen de espermatozoides.

En los casos de «sólo Sertoli», de todas formas, los túbulos están colapsados, con tinción amarilla visible en la cara exterior de los túbulos, lo que representa la hiperplasia de las células de Leydig. Si existen espermatozoides, el cirujano puede determinarlo en bastantes casos con el microscopio, observando los túbulos que no están colapsados.

Aun así, en algunos casos de «sólo Sertoli» con espermatozoides, la visión microquirúrgica no ayuda, y todos los túbulos parecen uniformemente colapsados. En los casos microquirúrgicos con muy pocos espermatozoides, y en aquellos cuyos túbulos con espermatozoides no podrían ser diferenciados de los túbulos sin espermatozoides, todavía deben obtenerse cantidades relativamente altas de tejido.



Figura 42.9. Cierre microquirúrgico de la túnica albugínea de los testículos con suturas interrumpidas de nailon de 9-0 tras un TESE microquirúrgico, que no aumenta la presión intratesticular y, por tanto, sin pérdida de la función testicular.

A pesar de todo, se produjo un mínimo daño, porque el flujo sanguíneo no fue interrumpido, las pequeñas hemorragias fueron coaguladas meticulosamente, la túnica albugínea no fue traspasada a causa del cierre con las suturas de nailon de 9-0 y, en consecuencia, no hubo un incremento de la presión sanguínea intratesticular.

CARTOGRAFIADO HISTOLÓGICO TESTICULAR

En los casos con toma de muestras de tejido contiguas, para el cartografiado se dispuso de una amplia visión de un segmento entero de los testículos de ambos lados (Fig. 42.8C). La histología demostró una distribución difusa, pero esparcida, de la espermatogénesis en todas ellas, confirmando directamente nuestra sugerencia inicial. El resultado osciló desde 1 túbulo con espermatozoides por tira grande contigua de tejido, hasta 5 túbulos con espermatozoides por tira de tejido, en un total de más de 100 secciones transversales. La visión histológica de una distribución difusa se corresponde con las observaciones microquirúrgicas. Cuando pudieron observarse túbulos dilatados normales en comparación con túbulos delgados, los dilatados contenían espermatozoides, y estaban distribuidos difusamente a lo largo del testículo.

De cualquier forma, existían concentraciones *variables* de focos espermátidos en los diferentes pacientes (Fig. 42.10A y B). En el 12 %, la distribución de los espermatozoides estaba tan dispersa que podría claramente explicar los casos en los que una biopsia abierta, realizada de forma aleatoria, podría perfectamente no localizar los focos espermátidos^{13,24}. Más aún, es muy fácil ver por qué la biopsia aleatoria con agujas no localizaría el foco en el 86 % de los casos^{27,30}.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De los 45 casos originales de varones sometidos a biopsia testicular diagnóstica previa sin la realización de un cartografiado, concluimos indirectamente, a partir del potencial predictivo de la biopsia aleatoria, que en estos pacientes había una distribución de la espermatogénesis difusa (aunque dispersa) más que regional¹³. También concluimos que obtuvimos más tejido testicular del necesario para el TESE¹³. De cualquier forma, los malos resultados de la biopsia testicular con aguja en la azoospermia no obstructiva, comparados con la biopsia abierta, parecen ser una contradicción a nuestra conclusión de que se obtenía demasiado tejido^{27,29-30}.

Más aun, no disponemos de una buena explicación para ese 12-15 % de casos en los que una biopsia diagnóstica previa no era predictiva del éxito del TESE. La respuesta a esa duda la obtuvimos en los siguientes esfuerzos al cartografiar¹⁸.

Los descubrimientos actuales refuerzan el entusiasmo de Schlegel^{32a,32b} para una aproximación inicial al TESE, y proporciona en el cartografiado pruebas directas de una distribución más difusa que regional de la espermatogénesis en la azoospermia no obstructiva^{13,32a-32b}.

Además, la variación de la dispersión de la espermatogénesis, confirmada por la observación de varias tiras contiguas de tejido, explica por qué en una biopsia única aleatoria pueden encontrarse o no espermatozoides, y por qué el tomar partes muy pequeñas del tejido a ciegas con una aguja se puede obtener una tasa de éxito razonable en la azoospermia obstructiva, pero una tasa de éxito muy baja en la azoospermia no obstructiva. La solución para los casos difíciles de azoospermia no obstructiva sería tomar mayores porciones del testículo o la preselección con microcirugía de un pequeño foco espermátido. La última opción es, obviamente, preferible.

De cualquier forma, incluso en aquellos casos en los que la única solución es la obtención de una mayor cantidad de tejido testicular, la microcirugía todavía ofrece una opción mejor.

El formidable deterioro que se ha observado en los TESE demasiado agresivos está causado por la interferencia directa con la aportación microvascular de los túbulos seminíferos o, de un modo más común, un incremento en la presión intratesticular causado por pequeñas hemorragias en la túnica albugínea.

La túnica albugínea es un envoltorio poco flexible. Un pequeño grado de derrame intratesticular causa un notable aumento de la presión intratesticular, que puede ser perfectamente observado por cualquiera que realice una biopsia de muestreo múltiple convencional para TESE. Más aún, el cierre de las biopsias abiertas con la sutura no microquirúrgica usual, particularmente las realizadas con rapidez, comprometen más aún el volumen intratesticular, con lo que se suma al incremento de la presión. Con una biopsia diagnóstica convencional rutinaria, el daño debe ser insignificante^{32a}.

Un enfoque microquirúrgico por TESE en todos los casos que hemos realizado no produce un incremento de la presión testicular, principalmente por tres motivos. El primero es que es más fácil evitar la interrupción del flujo sanguíneo en las diferentes regiones de los túbulos seminíferos. La segunda razón, que es extremadamente importante cuando se necesitan obtener grandes cantidades de tejido, es que puede llegarse a alcanzar una hemostasia meticulosa con el fórceps microbipolar, teniendo una adecuada visualización microquirúrgica de las áreas de corte. La tercera razón que permite la microcirugía con el mínimo daño tisular, incluso cuando se obtienen grandes piezas de testículo, es la sutura microquirúrgica de la túnica albugínea con suturas interrumpidas de nailon de 9-0.

Esta técnica de microsutura, utilizando particularmente la sutura interrumpida, permite un cierre de la túnica albugínea sin comprometer el espacio intratesticular (Fig. 42.9). Por tanto, cualquier tejido escindido es la única pérdida que el paciente debe sufrir en este procedimiento de TESE.

Los varones con azoospermia no obstructiva causada por un fallo germinal tienen una media de 0-3 espermátides maduras por sección transversal de túbulo seminífero, comparado con las 17-35 espermátides maduras por túbulo en varones con espermatogénesis normal y azoospermia obstructiva^{13,23,35}. Esto sugiere que en la biopsia testicular deben existir al menos tres espermátides maduras por túbulo para que algún espermatozoide alcance el eyaculado. Más de la mitad de los pacientes azoospermicos con fallo germinal tienen mínimos focos de espermatogénesis, cantidad insuficiente para permitir el «derrame» de los espermatozoides en el eyaculado. Cuando la espermatogénesis excede las tres espermátides maduras por túbulo, el paciente es oligospermico, en lugar de azoospermico.

Grados de azoospermia

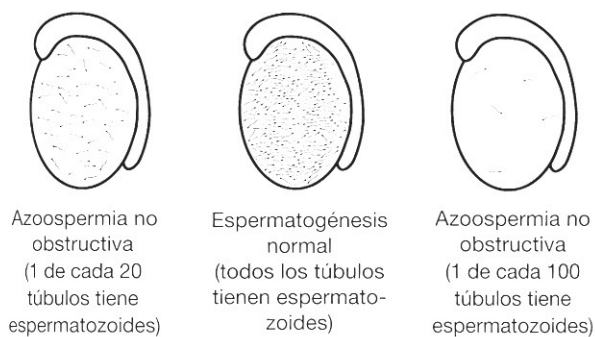


Figura 42.10A. Representación esquemática de los grados de espermatogénesis en los diferentes tipos de azoospermia, como se demuestra en el cartografiado observacional directo con la microcirugía y con la histología de amplias preparaciones de testículo, así como múltiples biopsias pequeñas discontinuas.

Distribución de la espermatogénesis en el testículo

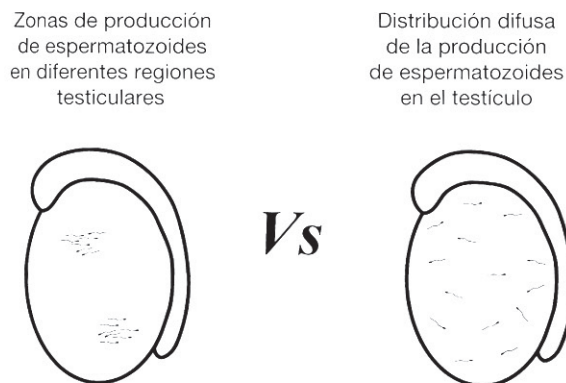


Figura 42.10B. TESE microquirúrgico en una azoospermia no obstructiva.

Un conocimiento de la distribución de la espermatogénesis puede mejorar la eficiencia del TESE. Ahora tenemos pruebas directas de que si la espermatogénesis está presente en los casos de azoospermia no obstructiva, está distribuida difusamente a lo largo de los testículos y no está limitada a una región concreta. Esto explica por qué en los casos con espermatogénesis mínima la biopsia testicular abierta con la obtención de grandes muestras de tejido tiene más éxito que la biopsia aleatoria con aguja, con la obtención de cantidades de tejido mucho menores. Esto también explica por qué en el 85 % de los casos en los que se tiene éxito, es tan probable encontrar espermatozoides en una biopsia abierta aleatoria en cualquier lugar de los testículos como en cualquier otra región de los espermatozoides. De cualquier modo, está claro que en los casos con focos de espermatogénesis extremadamente dispersos, una biopsia abierta aleatoria puede no ser capaz de localizar focos espermatogénicos, que sí podría conseguir con un muestreo más extensivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M *et al*. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342, 1237.
- Devroey P, Liu J, Nagy P, Tournaye H, Silber SJ, and Van Steirteghem, AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI). *Fertil Steril* 1994; 62, 639-641.
- Silber SJ, Nagy P, Liu J *et al*. Conventional IVF versus ICSI for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994; 9, 1705-1709.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J *et al*. High fertilization and pregnancy rates after ICSI with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995a; 10, 148-152.
- Devroey P, Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Joris H *et al*. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1995a; 10, 903-906.
- Silber SJ, Nagy P, Liu J *et al*. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995b; 10, 2031-2043.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC and Devroey P. Sertoli cell only revisited. *Hum Reprod* 1995c; 10, 1031-1032.
- Silber SJ and Rodríguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril* 1981; 36, 480-485.
- Zuckerman Z, Rodríguez-Rigau LJ, Weiss DB *et al*. Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicle biopsies and the relation of spermatogenesis to sperm density. *Fertil Steril* 1978; 30, 448-455.
- Steinberger E and Tjioe DY. A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. *Fertil Steril* 1968; 19, 960-970.
- Devroey P, Liu J, Nagy Z, Van Steirteghem AC and Silber SJ. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995b; 10, 1457-1460.
- Silber SJ, Liu J, Van Steirteghem AC *et al*. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66, 110-117.
- Silber SJ, Nagy Z, Devroey P *et al*. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 1997; 12, 2422-2428.
- Silber SJ, Verheyen G and Van Steirteghem AC. Spermatid conception. *Hum Reprod* 1998; 13, 2976-2977.
- Silber SJ and Johnson L. Are spermatid injections of any clinical value? ROSNI and ROSI revisited. *Hum Reprod* 1998; 13, 509-523.
- Silber SJ, Johnson L, Verheyen G, and Van Steirteghem A. Round spermatid injection. *Fertil Steril* 2000; 73, 897-900.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals; seminiferous epithelium cycles and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52, 198-236.
- Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000a; 15, 2278-2284.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H *et al*. High fertilization and implantation rates after ICSI. *Hum Reprod* 1993; 8, 1061-1066.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after ICSI of a single spermatozoon into oocyte. *Lancet* 1992; 340, 17-18.
- Tournaye H, Liu J, Nagy Z *et al*. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11, 127-132.
- Tournaye H, Verheyen G, Nagy P *et al*. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12(1), 80-86.
- Silber SJ, Patrizio P and Asch RH. Quantitative evaluation of spermatogenesis by testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiration. *Hum Reprod* 1990a; 5, 89-93.
- Silber SJ. Evaluation and treatment of male infertility. *Clinical Ob/Gyn* 2000b; 43, 854-888.
- Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14, 131-135.

26. Craft I, Tsirigotis M, Courtauld E and Farrer-Brown G. Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997; 12, 1483-1487.
27. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D and Ron-el R. Testicular sperm retrieval by percutaneous five needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12, 1488-1491.
28. Rosenlund B, Kvist V, Ploen L, *et al.* A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13, 1266-1271.
29. Ezeh VIO, Moore HDM, and Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13, 3075-3080.
30. Friedler S. Letters-to-the-editor. Testicular sperm aspiration (TESA): the appropriate technique. *Hum Reprod* 1998; 13, 1111-1114.
31. Hauser R, Botchan A, Anuit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, Lessing JB, Yogev L and Yavetz H. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia - is it necessary? *Hum Reprod* 1998; 13, 3081-3085.
- 32a. Schlegel PN and Su LM. Physiologic consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12, 1688-1692.
- 32b. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M *et al.* Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. *Urology* 1997; 49, 435-440.
33. Holstein AF, Roosen-Runge ED (eds.). Atlas of Human Spermatogenesis. Grosse Verlag, Berlin, 1981.
34. Holstein AF, Roosen-Runge ED (eds). Illustrated Pathology of Human Spermatogenesis. Grosse Verlag, Berlin, 1988.
35. Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, and Asch RH. Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Eng J Med* 1990b; 323, 1788-1792.
36. Ogura A and Yanigamachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 1993; 48, 219-225.
37. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, *et al.* An improved treatment procedure for testicular biopsy specimens offers more efficient sperm recovery. *Fertil Steril* 1997; 68, 376-379.