

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN ESPECIALIDADES MÉDICAS



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

BIOPSIA TESTICULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL FACTOR
MASCULINO EN INFERTILIDAD: REVISIÓN DE LA LITERATURA

Revisión bibliográfica sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades Médicas para optar al
grado y título de Especialista en Anatomía Patológica

CARLOS MANUEL JONES BARRANTES

Servicio de Patología, Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica, 2021

DEDICATORIA

A mis padres por su amor y sus enseñanzas,
a Diego y Alyssa, mis hijos, mis motores, que hacen que todo valga la pena,
pero sobre todo a mi esposa Carla, por su apoyo incondicional y por siempre tener fe en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros y maestra del Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez
a quienes admiro y respeto,
y a mis compañeros de residencia Juan José y Rubén.

'Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Especialidades Médicas de la Universidad de
Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de
Especialista en Anatomía Patológica"




Dra. Karina Sosa Barrantes

Profesora Guía



Dra. Tilia López Quirada

Lectora



Dra. Eva Moreno Medina

Directora

Programa de Posgrado de Especialidades Médicas en Anatomía Patológica



Carlos Manuel Jones Barrantes

Sustentante

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
HOJA DE APROBACIÓN	IV
TABLA DE CONTENIDOS	V
OBJETIVO GENERAL	VI
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	12
CONTEXTO HISTÓRICO NACIONAL	13
INFERTILIDAD MASCULINA	15
INDICACIONES PARA BIOPSIA TESTICULAR	17
AZOOSPERMIA OBSTRUCTIVA VS. AZOOSPERMIA NO OBSTRUCTIVA	20
TÉCNICA PARA TOMA DE BIOPSIA Y MANEJO DE LA MUESTRA	22
HISTOLOGÍA Y DESARROLLO NORMAL DE CÉLULAS GERMINALES	26
VALORACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS	29
PATRONES DE ESPERMATOGÉNESIS	32
• SÍNDROME DE SOLO CÉLULAS DE SERTOLI	34
• ARRESTO DE LA MADURACIÓN	36
• HIPOESPERMATOGÉNESIS	38
• HIALINIZACIÓN DE TÚBULOS SEMINÍFEROS	40
• PATRONES MIXTOS	42
ABORDAJE DE LA BIOPSIA TESTICULAR POR INFERTILIDAD	44
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

OBJETIVO GENERAL

Describir la utilidad del estudio histopatológico de la biopsia testicular en el diagnóstico del paciente masculino con infertilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las alteraciones histológicas en las biopsias testiculares realizadas a hombres infértiles.
- Resumir las indicaciones del estudio histológico de la biopsia testicular en pacientes con infertilidad.
- Enumerar las técnicas para obtener la biopsia testicular.
- Describir la técnica adecuada para el manejo de las biopsias de testículo en el estudio del hombre infértil.
- Mostrar la utilidad del análisis patológico de las biopsias de testículo en pacientes infértiles.
- Establecer el rol del patólogo en el estudio del paciente masculino con infertilidad.
- Proponer un abordaje práctico para la interpretación de la biopsia testicular por infertilidad.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Artefactos de la manipulación en espermatogénesis normal. A, Tejido fijado en solución de Bouin que muestra artefacto mínimo y es adecuado para la interpretación. B, El tejido fijado en formalina da lugar a artefacto marcado de la contracción y a morfología celular pobre con el desprendimiento luminal de células. C, Túbulos seminíferos con artefacto de aplastamiento adquirido durante el manejo de las muestras que produce contornos tubulares irregulares, obliteración de la luz y citología oscurecida con núcleos angulares e hipercromáticos, ocultando las espermátides maduras (hematoxilina-eosina, aumento original 3400 [A, B y C]). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 24.

FIGURA 2: Espermatogénesis normal (A, $\times 10$; B, $\times 40$). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y todos los tipos de células están representados incluyendo células de Sertoli (SC), espermatogonia (S'gonia), espermaticitos (S'cytes), y espermátides redondas (rST) y alargadas (eST). Las estructuras de la cola asociadas con las espermátidas Sd2 se ven claramente, al igual que los cuerpos residuales (RB). La membrana basal del túbulo (BM) se observa con el intersticio que contiene células de Leydig (LC), vasos sanguíneos (BV) y elementos fibrosos dispersos. (R.I.McLachlan, 2007).

Página 28.

FIGURA 3: Espermatogénesis normal, los tipos de células. Este diagrama ilustra las características citológicas de los tipos principales de células germinales dentro del epitelio seminífero. La estadificación de la espermatogénesis utiliza la descripción y clasificación utilizada por Clermont (1963). Ad, espermatogonia A, oscuro; Ap, espermatogonia A, pálido; B, espermatogonia B; L, espermaticito de leptoteno; Z: espermaticito de cigoteno; PS, espermaticitos de paquiteno; M, división meiótica, Sa–d, espermátides a–d. (R.I.McLachlan, 2007)

Página 28.

FIGURA 4: Síndrome de solo células de Sertoli. Los túbulos tienen un diámetro reducido, sin células germinales, y grandes células maduras de Sertoli. Hay una prominencia de las células de Leydig en el intersticio en esta biopsia de un paciente adulto con el síndrome de Klinefelter, aunque éste no

sea un hallazgo específico (H&E, aumento original 3100). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 35.

FIGURA 5: Arresto de la maduración. Las secciones muestran una variación en el diámetro tubular y luminal. Nótese la ausencia de espermátides maduras, mientras que los espermatoцитos primarios siguen siendo prominentes (H&E, magnificación original 3400). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 37.

FIGURA 6: Hipoespermatogénesis. Las secciones muestran diámetros tubulares y lumbinales variables reducidos y una reducción total de células germinales, pero todos pueden ser identificados, incluyendo espermátides maduras ocasionalmente. El examen de alto poder puede ser necesario para observar la presencia de espermátides maduras, los núcleos de los cuales aparecen oscuros y angulados. Estos hallazgos se ven comúnmente en conjunto con túbulos escleróticos y /o túbulos que contienen sólo células de Sertoli (H&E, aumento original 3200). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 39.

FIGURA 7: Atrofia y fibrosis. Los túbulos atróficos tienen una membrana basal gruesa y prominente, con un aspecto hialinizado que rodea un lumen borrado en gran parte por el tejido fibroso. Esta es la etapa final de un gran número de procesos que causan lesiones tubulares (H&E, aumento original 3200). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 41.

FIGURA 8: Fenotipos mixtos y características especiales. (A) La heterogeneidad de la espermatogénesis en biopsias de hombres con oligozoospermia se muestra con un túbulo revestido sólo por las células de Sertoli adyacentes a los túbulos que muestran espermatogénesis completa. Tal biopsia se debe categorizar como hipoespermatogénesis, pero, se debe agregar en los comentarios la presencia de túbulos con patrón de células de Sertoli solamente ($\times 25$). (B) Otro ejemplo de la apariencia heterogénea del epitelio seminífero asociado con el daño testicular. La flecha muestra una pérdida severa de células germinales, y en otras áreas (puntas de flecha) la vacuolación de las células de Sertoli está presente. Las agregaciones de células de Leydig (LCA) son visibles en el compartimento intersticial. ($\times 10$). (C) Un ejemplo de testículo inmaduro que muestra

cordones seminíferos sin lumen y ocupados por gonocitos (flechas) y células inmaduras de Sertoli sin los nucleolos prominentes vistos en las células adultas de Sertoli. El tejido intertubular no contiene células de Leydig (LC) ($\times 10$). (D) Una imagen mixta de la detención de células germinales en la etapa de espermatogonia, túbulos que muestran la hialinización seminífera (flechas) a veces denominadas "túbulos fantasmas" y las células de Leydig intercaladas (puntas de flecha, LC) ($\times 25$). (E) El aspecto típico de una biopsia de un hombre con síndrome de Klinefelter que muestra hialinización de túbulos seminíferos (flechas), agregaciones del LC y de túbulos ocasionales con las células de Sertoli solamente. Este patrón no es diagnóstico del síndrome de Klinefelter y puede resultar de una gama de procesos patológicos ($\times 10$). (F) Una biopsia de un hombre con síndrome de Klinefelter que ilustra un túbulo con espermatogénesis completa rodeada por agregaciones del LC ($\times 25$). Todos los tejidos están fijados en fijador GR, excepto F, que se fija en el fijador de Cleland, y todos teñidos con H&E. (R.I. McLachlan, 2007).

Pag 43.

FIGURA 9: Algoritmo diagnóstico para la interpretación de la biopsia testicular por infertilidad. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Pag 46.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Indicaciones para biopsia testicular. (R.I.McLachlan, 2007).

Página 19.

Tabla 2: Abordaje para la preparación de la biopsia testicular para evaluación histológica. (R.I.McLachlan, 2007).

Página 25.

Tabla 3: Clasificación de alteraciones de espermatogénesis humana. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Página 33.

LISTA DE ABREVIATURAS

H&E: Hematoxilina y eosina

PAS: Ácido periódico de Schiff

FNA: Aspiración por aguja fina

IVF: Fertilización in vitro

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

TESE: Extracción testicular de espermatozoides

MA: Arresto de la maduración

SCOS: Síndrome de solo células de Sertoli

OA: Azoospermia obstructiva

NOA: Azoospermia no obstructiva

ART: Técnicas de reproducción asistida

OMS: Organización Mundial de la Salud

ESRHE: Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología

CCSS: Caja Costarricense del Seguro Social

TEFNA: Aspiración con aguja fina testicular

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

UMRAC: Unidad de Medicina Reproductiva de Alta Complejidad

INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la falla para concebir luego de 12 meses de relaciones sexuales frecuentes, sin utilizar métodos anticonceptivos en pacientes femeninas menores de 35 años o luego de 6 meses de relaciones sexuales frecuentes sin uso de métodos anticonceptivos en mujeres de 35 años o mayores (Penzias, 2020). La causa de dicha infertilidad puede ser de factor femenino o masculino.

La infertilidad puede ser primaria cuando nunca se ha logrado un embarazo o secundaria cuando se ha logrado un embarazo previamente. Según la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESRHE) una de cada seis parejas en todo el mundo experimenta algún tipo de infertilidad por lo menos una vez durante su vida reproductiva, a su vez la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que del 10 al 15% de parejas tienen algún tipo de infertilidad. (Speroff L., 2006).

Los tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad han permitido que muchas parejas en el mundo logran concebir. Estas son técnicas que se han incorporado hacia fines de la década del 70 y desde entonces son ampliamente utilizadas.

Cuando una pareja completa el estudio exhaustivo por factores y agota sus posibilidades de embarazo con técnicas de baja complejidad reproductiva, sin lograr el mismo, debe considerarse un tratamiento de mayor complejidad reproductiva como lo es la Fertilización in vitro (FIV), la cuál es una técnica de reproducción asistida (TRA) que involucra fertilización extracorpórea.

Las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad son aquellos tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación de ovocitos, espermatozoides o embriones para lograr un embarazo. Esto incluye, pero no está limitado a, fertilización in vitro, transferencia de embriones, criopreservación y donación de gametos y/o embriones. Los tratamientos de alta complejidad son el último eslabón en el abordaje de la infertilidad.

CONTEXTO HISTÓRICO NACIONAL

En Costa Rica, el Decreto Ejecutivo No. 24029-S del 3 de febrero de 1995, autorizaba la práctica de la Fertilización In Vitro (FIV) para parejas conyugales y regulaba su ejecución, por lo que la técnica de FIV fue practicada en Costa Rica entre los años 1995 y 2000, lapso en que nacieron 15 costarricenses.

El 7 de abril de 1995 el abogado Hermes Navarro del Valle acudió ante la Sala Constitucional y presentó una acción de inconstitucionalidad contra dicho Decreto Ejecutivo, utilizando diversos alegatos sobre violación del derecho a la vida. Fue hasta el 15 de marzo del año 2000 cuando la Sala Constitucional de la Corte Suprema emitió sentencia, mediante la cual declaró “con lugar la acción, y se anula por inconstitucional el Decreto Ejecutivo No. 24029-S”; mediante resolución 2000-02306, debido a la violación del principio de reserva de ley y por considerar la Sala que la técnica FIV atenta contra la vida y dignidad del ser humano.

El 19 de enero del 2001 se presentó ante la Comisión Interamericana de Derechos Humanos, una petición por parte del abogado Gerardo Trejos Salas en la cual se alegaba que la prohibición decretada por la Sala Constitucional de Costa Rica crea una violación continuada a varios derechos protegidos por la Convención Americana.

Para el 29 de julio del 2011 la Comisión Interamericana de Derechos Humanos sometió a la jurisdicción de la Corte Interamericana el caso número 12.361 contra el Estado de Costa Rica. Como es bien sabido, esta autoridad falló contra el Estado de Costa Rica en la sentencia del 28 de noviembre del 2012, y le requiere a Costa Rica restablecer la práctica de la FIV y que sea exigible para personas infértiles. Entre los puntos más importantes de esta sentencia se pueden mencionar los siguientes:

“El Estado debe adoptar, con la mayor celeridad posible, las medidas apropiadas para que quede sin efecto la prohibición de practicar la FIV y para que las personas que deseen hacer uso de dicha técnica de reproducción asistida puedan hacerlo sin encontrar impedimentos al ejercicio de los derechos que fueron encontrados vulnerados en la presente sentencia. El Estado deberá informar en seis meses sobre las medidas adoptadas al respecto, de conformidad con el párrafo 336 de la presente sentencia.

El Estado debe regular, a la brevedad, los aspectos que considere necesarios para la implementación de la FIV, teniendo en cuenta los principios establecidos en la presente sentencia, y debe establecer sistemas de inspección y control de calidad de las instituciones o profesionales calificados que desarrollen este tipo de técnica de reproducción asistida. El Estado deberá informar anualmente sobre la puesta en vigencia gradual de estos sistemas, de conformidad con el párrafo 337 de la presente sentencia.

El Estado debe incluir la disponibilidad de la FIV dentro de sus programas y tratamientos de infertilidad en su atención de salud, de conformidad con el deber de garantía respecto al principio de no discriminación. El Estado deberá informar cada seis meses sobre las medidas adoptadas para poner gradualmente estos servicios a disposición de quienes lo requieran y de los planes diseñados para este efecto, de conformidad con el párrafo 338 de la presente sentencia”.

En respuesta a lo anterior el Presidente de la República Luis Guillermo Solís Rivera, mediante el Decreto N° 39210-MP-S del 10 de setiembre del 2015 publicado en la Gaceta número 178 del 11 de setiembre del 2015 “Autorización para la realización de la técnica de reproducción asistida de fecundación in vitro y transferencia embrionaria” (Solís, 2015) autoriza la realización de la técnica de reproducción asistida de fecundación in vitro con la finalidad de garantizar los derechos reproductivos de las personas con infertilidad. Dicho decreto reconoce la FIV como un tratamiento médico que ayuda a las personas con infertilidad a mejorar sus posibilidades de lograr un embarazo, como parte del derecho a la salud que le corresponde a dichas personas.

No obstante, la Sala IV decidió acoger un recurso de inconstitucionalidad. El Estado fue nuevamente demandado ante la Corte Interamericana de Derechos Humanos por 6 parejas más en enero del 2016. Bajo ese escenario la Corte Interamericana de Derechos Humanos, en resolución del 26 de febrero de 2016, resolvió validar el citado decreto, con lo cual se obliga al Estado costarricense a aplicar la técnica de fertilización in vitro en el país, tanto en el sector público como en el privado.

Por lo tanto, la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) debe incluir la técnica de FIV dentro de la oferta institucional de servicios de salud.

Gracias a esto, desde la reinstauración de la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en Costa Rica y con la construcción de la Unidad de Medicina Reproductiva de Alta Complejidad (UMRAC), se han logrado 89 embarazos y el nacimiento de 37 recién nacidos vivos y sanos.

INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad no es un problema infrecuente en las sociedades occidentales con aproximadamente un 15% de parejas experimentando problemas para lograr la concepción. En un 25% a un 50% de estos casos la infertilidad masculina es la principal causa etiológica y en un 30 a 40% de los casos contribuye en la infertilidad de la pareja. De estos hombres se calcula que el 15% son azoospermicos (Arighno Das, 2020).

A pesar de lo anteriormente mencionado, sigue siendo un problema de salud poco estudiado y comprendido. Si bien la evaluación del factor masculino en la infertilidad se ha basado principalmente en la historia clínica, el examen físico, los valores séricos hormonales, el análisis de semen y los exámenes complementarios, la biopsia testicular puede proveer información muy valiosa al urólogo o andrólogo para lograr categorizar al paciente con azoospermia, con el propósito de dar un pronóstico y brindar un tratamiento adecuado.

El conocimiento de la patología testicular es de suma importancia ya que logra diferenciar alteraciones testiculares que no han sido diagnosticadas por otros estudios como los niveles de la hormona folículo estimulante y el volumen testicular. Un adecuado diagnóstico patológico juega un rol crucial en el diagnóstico y tratamiento de aquellos hombres con dificultad para procrear.

Las causas de infertilidad masculina son más fácilmente divididas en 3 categorías mayores: pre testicular, testicular y post testicular. Las causas pre testiculares de infertilidad son aquellas que se originan en el hipotálamo, hipófisis o glándulas suprarrenales que tienen un efecto adverso en la espermatogénesis a través de la supresión o estimulación hormonal aberrante. Las causas testiculares son defectos primarios de los testículos. Estos pueden ser congénitos o adquiridos. Las causas post testiculares de infertilidad consisten principalmente en disfunción eyaculatoria, o en obstrucciones de los ductos que salen de los testículos., (Ahmet Gudeloglu, 2013).

Una de las indicaciones principales para realizar una biopsia testicular en el estudio del paciente infértil, es la necesidad de diferenciar entre la azoospermia originada por problemas obstructivos (OA), de la azoospermia no obstructiva (NOA). Ya que tienen implicaciones clínicas y terapéuticas diferentes.

La NOA se puede dividir en NOA central y NOA testicular. Generalmente, los hombres con azoospermia, testículos de tamaño normal y niveles normales de hormona folículo estimulante

(FSH), tienen espermatogénesis normal y son más propensos a tener OA, mientras que los hombres con una elevación significativa en la FSH tienen insuficiencia testicular y, por lo tanto, NOA. Los niveles bajos de gonadotropinas y testosterona baja o normal sugieren un diagnóstico de NOA central. El diagnóstico etiológico se hace basado en una historia clínica detallada, examen físico, y una evaluación endocrina, además de pruebas complementarias. (Medicine, Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion, 2018)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define azoospermia como la ausencia de espermatozoides en al menos 2 muestras diferentes de eyaculado (incluyendo el sedimento centrifugado) (Cooper, 2010). Para muchos hombres azoospermicos, la utilización de técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se ha convertido en la principal opción terapéutica.

El valor de la biopsia testicular ha disminuido como resultado de la falta de familiaridad a la hora de reportar estos especímenes por el patólogo. El propósito de la revisión es describir adecuadamente el proceso de espermatogénesis, lograr tener definiciones claras sobre las alteraciones de células germinales en el paciente azoospermico de causa no obstructiva y tratar de proponer un abordaje que permita a los patólogos estar más familiarizados con este tipo de biopsia para lograr uniformidad en los reportes y que esta información sea de utilidad clínica.

INDICACIONES PARA BIOPSIA TESTICULAR POR INFERTILIDAD

La evaluación de un hombre con azoospermia incluye análisis de semen, una historia clínica y examen físico completo, estudios genéticos y perfil hormonal. Desafortunadamente estos estudios no son siempre conclusivos. De tal manera que la biopsia testicular cuando es interpretada adecuadamente puede ser la piedra angular en la cual un especialista en fertilidad masculina se base para formular un plan de tratamiento para estos hombres. (A. Jungwirth, 2016)

La biopsia testicular está generalmente reservada para hombres azoospermicos. Esta patología está asociada a una variedad de testiculopatías, que van desde una espermatogénesis normal con obstrucción o ausencia de los tractos seminales de salida o de los conductos deferentes (azoospermia obstructiva), hasta una variedad de problemas con alteraciones propias de la espermatogénesis (azoospermia no obstructiva). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

La biopsia testicular es comúnmente realizada en hombres infértiles para valorar la morfología y la función testicular, y para diferenciar entre la azoospermia obstructiva y la no obstructiva (Angelo Carpi A. A., 2011). De acuerdo con múltiples guías internacionales, no hay consenso sobre si la biopsia testicular diagnóstica debe realizarse en uno o ambos lados. Por lo tanto, las biopsias de diagnóstico unilaterales y bilaterales son ambas aceptadas. (Gerald Puhse, 2011).

Hasta hace poco se asumía que el paciente con azoospermia no obstructiva era intratable. El descubrimiento que los hombres azoospermicos con alteraciones de células germinales, pudieran tener focalmente zonas de espermatogénesis completa, se ha observado en estudios recientes de análisis cuantitativo de la espermatogénesis y ha permitido desarrollar estrategias para su tratamiento. (M Rashed, 2007).

En este trabajo se explicará con detalle aquellas causas de infertilidad relacionadas a azoospermia no obstructiva (NOA), que comprenden las anormalidades de células germinales y alteraciones del proceso de espermatogénesis ya que son las que más ameritan el estudio histopatológico testicular, esto con fines de pronóstico y tratamiento.

El desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para mejorar la habilidad de los espermatozoides para fertilizar un óvulo fue identificada en 1991 por los doctores Gianpiero Palermo y Andre Van Steirteghem en Bélgica. Durante un intento de colocar un espermatozoide

cerca de un óvulo, el doctor Palermo accidentalmente inyectó el espermatozoide directamente adentro del mismo. Este ovocito fertilizado se desarrolló hasta un embrión el cual fue transferido en el útero de la paciente y resultó en un embarazo con un parto de un recién nacido vivo y sano. Este “accidente” provocó una revolución en el tratamiento de la infertilidad (especialmente en el tratamiento del factor masculino severo).

Gracias a este descubrimiento, en la infertilidad debida a la azoospermia, la paternidad se puede lograr con espermatozoides recuperados del testículo (TESE) en combinación con la fertilización in vitro (FIV) con ICSI.

Estudios anteriores han indicado que la visualización microscópica de espermátides maduras en biopsias testiculares embebidas en parafina es el predictor más fuerte de la recuperación exitosa de espermatozoides por TESE. (Hans Ivar Hanevik, 2010). En hombres con obstrucción de conductos la recuperación de la esperma no es difícil, con tasas de obtención de estos de hasta un 100% (Dohle, 2012); sin embargo, entre los hombres con falla testicular o azoospermia no obstructiva, no se logran obtener espermatozoides para ICSI en un 25% a 50% de los casos.

En los hombres con azoospermia no obstructiva, las características clínicas no predicen adecuadamente si los espermatozoides se recuperarán durante la exploración testicular, sin embargo la recuperación exitosa de los mismos está más estrechamente relacionada con el tipo o patrón de defecto espermatogénico observado en la biopsia testicular. (Coopberg, 2005).

En un paciente azoospermico con obstrucción esperada (por ejemplo, vasectomía previa, cirugía bilateral de hernia inguinal) asociada con un nivel sérico normal de FSH, no es necesaria una biopsia diagnóstica. La reconstrucción quirúrgica con o sin la recuperación formal de espermatozoides se debe considerar en tales casos.

La biopsia tampoco está indicada en aquellos casos en los cual la causa de la azoospermia no obstructiva pueda ser determinada por la clínica (testículos pequeños), niveles séricos hormonales anormales o algún tipo de cromosomopatía, como en el síndrome de Klinefelter, la insuficiencia gonadotrópica prepuberal o el síndrome de Kallman.

En un subgrupo de hombres infértiles, existe un riesgo aumentado para desarrollar carcinoma in situ testicular, especialmente en hombres con historia de criptorquidia o en hombres con atrofia testicular. (Dohle, 2012). En este contexto también está indicada la biopsia testicular.

Tabla 1: Indicaciones para biopsia testicular. (R.I.McLachlan, 2007)

1	Determination of severity and type of spermatogenic failure Prognostic indicator for subsequent TESE and ICSI Phenotyping in clinical research context
2	Differentiation of obstructive from non-obstructive azoospermia Equivocal endocrine (FSH, inhibin B) and/or clinical findings Confirmation of spermatogenesis prior to: ART/ICSI (e.g. vasectomy, cystic fibrosis) Reconstructive surgery for obstruction
3	Evaluation for testicular neoplasia/CIS At time of orchidopexy (after childhood) In 'at risk' populations, e.g. prior cryptorchidism, suggestive ultrasonography (microlithiasis) Contralateral testis in setting of testis cancer
4	Cryopreservation of spermatids for ART
5	Failure of prolonged gonadotrophin therapy in hypogonadotropic hypogonadism Evaluation of prospects with continued therapy

TESE, testicular sperm extraction; ART, assisted reproductive technology.

AZOOSPERMIA OBSTRUCTIVA VS. AZOOSPERMIA NO OBSTRUCTIVA

A la hora de evaluar a un paciente azoospermico, es importante establecer si la condición es obstructiva (OA), o no obstructiva (NOA), pues el manejo de las dos condiciones puede ser totalmente diferente. En pacientes con OA, la espermatogénesis suele ser normal, pero los espermatozoides no pueden unirse al resto del eyaculado debido a la obstrucción a nivel del epidídimo, los conductos deferentes o los conductos eyaculatorios.

Las causas de OA se pueden dividir en congénitas y adquiridas. La causa más común de OA es la vasectomía. Sin embargo, la lesión puede también estar localizada en el epidídimo, los conductos deferentes o lesiones del conducto eyaculatorio en relación con infección genitourinaria, lesión iatrogénica durante procedimientos quirúrgicos escrotales o inguinales, y anomalías congénitas como la agenesia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD). (Hui Dai Lee, 2012).

La vasovasostomía es un procedimiento microquirúrgico con tasas de éxito variables para revertir la obstrucción. En los centros con mayor experiencia en el manejo de este tipo de pacientes, la vasovasostomía microquirúrgica da como resultado la aparición de espermatozoides en el eyaculado en cerca de 90% de los hombres y en tasas de embarazo que varían desde 50 a un 80%, dependiendo de la edad de la pareja y del tiempo transcurrido de la obstrucción (Rupert P. Amann, 2010).

La NOA, que representa alrededor del 60% de todos los casos de azoospermia, es en cambio caracterizada por un fallo testicular intrínseco, a menudo idiopática, que influencia negativamente la espermatogénesis. La recuperación quirúrgica de espermatozoides se ofrece a los pacientes afectados por NOA porque, aunque la espermatogénesis generalmente se ve comprometida, áreas focales de la espermatogénesis todavía pueden existir en sus testículos.

Cuando la cirugía de recanalización no es posible o no está indicada, en pacientes con OA, los espermatozoides generalmente se pueden recuperar con aspiración con aguja fina testicular (TEFNA), ya que se espera que la espermatogénesis normal esté presente de forma difusa en los testículos. Por el contrario, cuando se intenta la recuperación de espermatozoides en pacientes afectados por NOA, es necesario un TESE quirúrgico, con la esperanza de identificar áreas focales de espermatogénesis normal. Los espermatozoides viables se pueden utilizar frescos para un ciclo ICSI o pueden ser criopreservados para uso futuro.

Parámetros como los niveles hormonales, el volumen de testicular, la histología, y el perfil genético se utilizan actualmente para predecir la probabilidad de éxito de la recuperación de espermatozoides en hombres afectados por NOA, y tales predicciones pueden ayudar a los médicos a proporcionar a las parejas infértiles asesoramiento y tratamiento adecuados.

Desde finales de la década de 1990, se ha encontrado que la histología de testículos es el factor predictivo más confiable de la recuperación exitosa de espermatozoides en pacientes con NOA. (Gianmartin Cito, 2018).

La principal limitación de la biopsia de testículo es que no es representativa de toda la anatomía, ya que por lo general sólo se envía una sola muestra de cada testículo para la evaluación histopatológica, aunque los túbulos seminíferos de los pacientes azoospermicos son a menudo heterogéneos en todo el testículo. Sin embargo, el envío de muestras de testículo múltiples para el análisis histopatológico podría tener una influencia negativa en la función endocrina del testículo, al muestrear una mayor cantidad de tejido.

TÉCNICA PARA TOMA DE BIOPSIA Y MANEJO DE LA MUESTRA

La biopsia testicular puede realizarse bajo anestesia local o general. Usualmente el procedimiento es realizado de forma ambulatoria por un especialista en infertilidad masculina que en su mayoría son urólogos, andrólogos o ginecólogos con subespecialidad en dicho campo. Para una biopsia testicular diagnóstica se debe realizar una incisión escrotal de 2 a 3 cm que permita la exposición de la túnica albugínea del testículo. Se debe realizar una pequeña incisión en la cápsula testicular de aproximadamente 0,5 cm, con el propósito de obtener una biopsia de 3 x 3 x 3 mm. Para una adecuada clasificación de la espermatogénesis el tejido removido debe contener al menos 100 túbulos seminíferos. El tejido no debe ser comprimido con alguno de los instrumentos utilizados ya que puede distorsionar la arquitectura testicular y comprometer la adecuada valoración de los túbulos seminíferos. (Dohle, 2012).

Siempre que sea posible, al momento de realizar una biopsia testicular por infertilidad, se debería realizar una extracción testicular de espermatozoides (TESE). Esto con el fin de criopreservar el tejido para una potencial fertilización in vitro. (Richard A. Schoor, 2002)

Existe una alternativa a la biopsia testicular abierta con fines diagnósticos y terapéuticos, que es la punción transcutánea del testículo con una aguja gruesa o aspiración por aguja fina. La ventaja de la aspiración por aguja fina del testículo es que no requiere equipo quirúrgico especial o experiencia y puede ser realizada en el paciente de forma ambulatoria y sin necesidad de anestesia general. Se vio una correlación del 88.5% entre biopsias tomadas con aguja fina y biopsias realizadas con técnica abierta en diferentes grupos de pacientes. La aspiración por aguja fina también demostró ser útil para el diagnóstico de lesiones testiculares pequeñas. (Rammou-Kinia, 1999). Adicionalmente desde finales de la década de los noventa se propuso la técnica de “mapeo” testicular por biopsia de aspiración por aguja fina (FNA), que consiste en múltiples punciones en el parénquima testicular con el fin de confirmar la producción de espermatozoides en hombres cuyos testículos tengan alteraciones obstructivas. (Monika E. Beliveau, 2011)

El procedimiento para obtener la biopsia testicular generalmente no tiene un índice alto de complicaciones, ocasionalmente puede ocurrir hemorragia o infecciones. Las biopsias tomadas en testículos pequeños atróficos pueden aumentar el riesgo de hipogonadismo que puede resultar en tratamiento sustitutivo de por vida con testosterona. Esta preocupación debe ser considerada de antemano y discutida con el paciente. El riesgo para el hipogonadismo después de la biopsia

testicular se aplica específicamente a los procedimientos de TESE realizados en testículos de pequeño tamaño. En un estudio se demostró que el riesgo de hipogonadismo aumenta en pacientes con síndrome de solo células de Sertoli y en pacientes con síndrome de Klinefelter. (Ishikawa, 2009). En la mayoría de los pacientes, los niveles de la testosterona se recuperan a los niveles previos a la biopsia en el plazo de 1 año debido a una elevación de la hormona luteinizante (LH). Al aumentar la edad, estos hombres pueden estar en riesgo para desarrollar hipogonadismo de inicio tardío. En pacientes con NOA, se debe hacer una valoración entre el riesgo de lesión debido a las biopsias múltiples y las ventajas diagnósticas y terapéuticas para el paciente. (G.R. Dohle, 2004).

Idealmente la biopsia tomada por el cirujano debe incluirse en un contenedor con solución fijadora previniendo la compresión del tejido. Se recomienda un fijador como la solución de Bouin (teniendo en cuenta sus problemas de vida útil reducida y toxicidad) (Dohle, 2012), por encima de la formalina bufferizada, ya que esta última puede producir un artefacto de encogimiento y provocar desprendimiento de las células, dificultando la valoración de las células germinales en sus diferentes estadios (Fig. 1, A-C).

La solución de Bouin está compuesta de ácido pícrico, ácido acético y formaldehído en una solución acuosa. Este fijador permite una tinción nuclear mejor y más nítida que la formalina bufferizada neutra al 10%. No es un buen fijador cuando se debe conservar la ultraestructura del tejido para microscopía electrónica. Sin embargo, es un buen fijador cuando se debe preservar una estructura de tejido con una textura suave y delicada. Los efectos de los tres productos químicos en la solución de Bouin se equilibran entre sí. La formalina hace que el citoplasma se vuelva basófilo, pero este efecto se equilibra con el efecto del ácido pícrico. Esto da como resultado una excelente tinción H&E nuclear y citoplasmática. El efecto de endurecimiento de los tejidos de la formalina se equilibra con la fijación de los tejidos blandos de los ácidos pícrico y acético. El efecto de hinchamiento del tejido del ácido acético se equilibra con el efecto de encogimiento del tejido del ácido pícrico.

Se deben realizar al menos 5 niveles del tejido con una separación de entre 4 y 5 micras, para ser teñidas posteriormente con H&E o ácido periódico de Schiff (PAS) para su evaluación. Las biopsias bilaterales han demostrado ser de gran utilidad debido a que aproximadamente 1/4 de las biopsias muestra variaciones de los patrones histológicos entre ambos testículos.

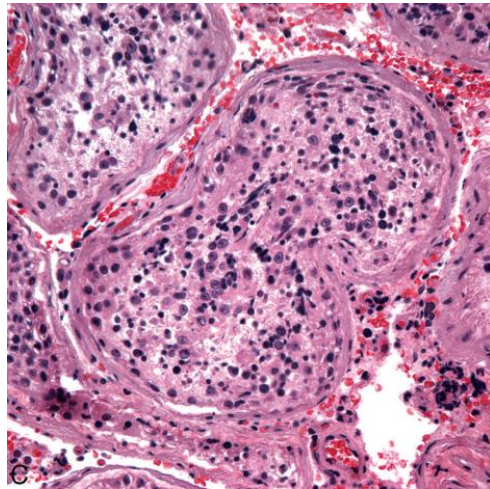
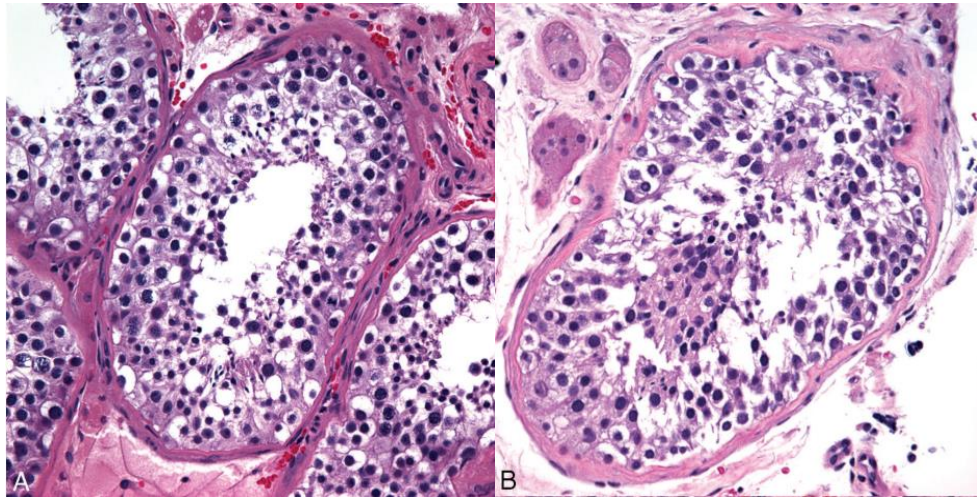


FIGURA 1: Artefactos de la manipulación en espermatogénesis normal. A, Tejido fijado en solución de Bouin muestra artefacto mínimo y es adecuado para interpretación. B, El tejido fijado en formalina da lugar a artefacto marcado de la contracción y a morfología celular pobre con el desprendimiento luminal de células. C, Túbulos seminíferos con artefacto de aplastamiento adquirido durante el manejo de muestras produce contornos tubulares irregulares, obliteración de la luz y citología oscurecida con núcleos angulares e hiperocrómicos que envuelven ocultando las espermátides maduras (hematoxilina-eosina, aumento original 3400 [A, B y C]). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

Tabla 2: Abordaje para la preparación de la biopsia testicular para evaluación histológica.

(R.I.McLachlan, 2007)

Procedure	Approach	Rationale
Surgical tissue sampling	Laterally at the cranial portion of the testis, away from epididymis	Minimization of damage to testicular vessels and a risk of sampling epididymis
Size of biopsy	3 × 3 × 3 mm (a grain of pepper or rice)	Representative for most cases, not too invasive
Number of biopsies	One, some centres advocate two	One is representative for most cases, using two biopsies increases CIS detection rate
Tissue handling	Drop the tissue directly from the scissors into a fixative receptacle: do not compress tissue. Alternatively, run a new scalpel blade horizontally across the tunica and drop the blade and tissue into fixative. For bilateral biopsies, use separate clearly marked vials (left or right testis)	Minimize artefacts, e.g. evulsion of tubule content into intertubular space Essential to recognize possibility of discrepancy histology between testes
Tissue processing (fixation and embedding)	Bouin's fluid or similar fixatives (e.g. GR fixative, which is a modified Stieve's fixative). Formalin should not be used routinely. Fixation time 3–24 h. Some centres prefer glutaraldehyde and plastic embedding (semithin section)	Formalin induces marked shrinkage and gives poor nuclear morphology (Figure 4E)→difficulty in germ cell and CIS recognition Deterioration with more prolonged exposure Semithin sections give excellent morphology but are not suitable for immunohistochemistry
Sectioning and number of slides	Standard microtome, 4 µm thick sections Cut 10 serial sections on each glass slide Total of 12 slides At the beginning and at the end of the series, cut additional double sections for Masson trichrome (MT), PAS and immunostaining	Good two-dimensional images A large number of sections minimize a risk of overlooking infrequent abnormalities or tubules showing completed spermatogenesis
Staining	Haematoxylin–eosin (HE) staining of every second glass with 10 serial sections Single slide stained by MT PAS staining of preferably two slides (e.g. numbers 2 and 10) Placental-like alkaline phosphatase (PLAP) [or other carcinoma <i>in situ</i> (CIS) marker] immunostaining of two sections at the beginning and the end of the series	HE provides excellent analysis of testicular morphology MT assists defining fibrosis and spermatid stage PAS helps to recognize microlithiasis and hyalinization and in some fixatives also CIS Immunohistochemical staining assists in detection of CIS
Evaluation and scoring	The observer must be well trained and experienced. It is preferable to have a second observer independently evaluate the biopsy, especially in cases with suspicion of neoplasia. A third opinion may be needed.	Minimizes the risk of an inadvertent overlooking of important findings and reporting errors

HISTOLOGÍA Y DESARROLLO NORMAL DE LAS CÉLULAS GERMINALES

El componente funcional activo de cada testículo consiste en varios cientos de túbulos seminíferos que llegan a medir hasta 70 cm de longitud. Es en estos túbulos que el proceso de espermatogénesis ocurre y en un testículo normal todas las etapas de diferenciación están presentes simultáneamente. Debido a esto la espermatogénesis normal no requiere que haya espermátides maduras normales en cada corte transversal de túbulos seminíferos. Varios estadios inmaduros pueden apreciarse normalmente y no deben ser mal interpretados como una anomalía de la maduración (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Rodeando cada túbulo se identifica una fina membrana basal que está formada por colágeno y fibras elásticas. Afuera de los túbulos se localiza el tejido intersticial ocupado por fibroblastos, mastocitos, macrófagos, nervios y vasos linfáticos. Durante la pubertad las células de Leydig que secretan testosterona maduran en este espacio. Las células de Leydig se pueden encontrar de forma solitaria o formando pequeños nidos y son fácilmente reconocibles porque tienen un prominente citoplasma granular eosinofílico. Es normal que contengan pequeñas gotas lipídicas, pigmento de lipofuscina, o inclusiones eosinofílicas en forma de “varita” en el citoplasma llamados cristales de Reinke. (Mills, 2012).

Las células de Sertoli de localización intra tubular, de forma piramidal elongada y cuya base se adhiere a la lámina basal tubular tiene funciones que favorecen la espermatogénesis. Los bordes celulares de las células de Sertoli parecen pobremente definidos, una característica que se logra ver ultra estructuralmente debido a sus numerosos procesos laterales que envuelven a las células espermatogénicas. El núcleo de una célula de Sertoli madura contiene un nucléolo central prominente, una característica útil para diferenciarlas fácilmente de las células germinales. (Mills, 2012)

El patólogo debe ser capaz de reconocer los tipos individuales de células, que se desarrollan a partir de la espermatogénesis en forma cronológica. El proceso empieza con la espermatogonia que se localiza junto a la lámina basal de los túbulos seminíferos. Es una célula relativamente pequeña de aproximadamente 12 micras con una cromatina nuclear con tinción pálida. Con la madurez sexual la espermatogonia se divide ya sea hacia una espermatogonia tipo A, quedando como una célula germinal indiferenciada; o se desarrolla a través de ciclos mitóticos hacia una espermatogonia tipo B. Está última da origen al espermatozoides primario que rápidamente sufre su primera división

meiótica y atraviesa 4 estadios de profase (leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno), antes de sufrir una metafase meiótica. Los 4 estadios de la profase requieren aproximadamente 3 semanas, por lo que numerosos espermatoцитos primarios están presentes en las secciones transversales de los túbulos seminíferos en una biopsia normal. El espermatoцитo primario es la más grande de las células germinales en el túbulo. Después de la división meiótica un espermatoцитo secundario más pequeño es formado, estas células son ocasionalmente visibles, pero típicamente en mucho menor cantidad debido al corto intervalo de tiempo que dura su estadio. Luego, rápidamente sufren una segunda división meiótica resultando en espermátides que miden entre 7 a 8 micras. Los espermátides son reconocibles no sólo por su pequeño tamaño sino también por su cromatina densa y oscura, y su posición yuxtaluminal dentro del túbulo. El proceso de diferenciación incluye el desarrollo de un flagelo con la continua pérdida del citoplasma y elongación nuclear, lo que resulta en la formación de un espermatozoides maduro, el cual se convierte en el producto final que será liberado hacia el lumen. (CM., 1987).

Los espermatozoides que abandonan el testículo no son capaces de moverse, de reconocer o fertilizar un óvulo, deben atravesar un largo conducto, el epidídimo, para adquirir estas habilidades. Las transformaciones post testiculares de los espermatozoides son llamadas en conjunto maduración espermática. El epidídimo es un ducto único con muchas circunvoluciones que mide aproximadamente 6 metros de largo. Debido a esto puede tomar desde 1 a 14 días para que un espermatozoides lo atraviese en su totalidad. Anteriormente se creía que el epidídimo era únicamente un tubo de depósito de espermatozoides. Se creía que el proceso de maduración era inherente en los espermatozoides y que no tenía nada que ver con el epidídimo. Ahora es claro que el epidídimo es un participante activo en el proceso de maduración, no sólo porque provee un apropiado microambiente de fluido luminal, sino también supliendo muchas de las moléculas que requieren los espermatozoides para lograr la fertilidad. Debido a que los espermatozoides son inmóviles en este punto (Kirichock, 2010), requieren asistencia para moverse a lo largo del epidídimo, este movimiento es facilitado por contracciones de músculo liso que rodean al ducto, así como por la presión que ejerce el fluido y los espermatozoides entrando al ducto provenientes de los testículos. Desde el punto de vista clínico una inadecuada función del epidídimo puede resultar en infertilidad. (Rupert P. Amann, 2010).

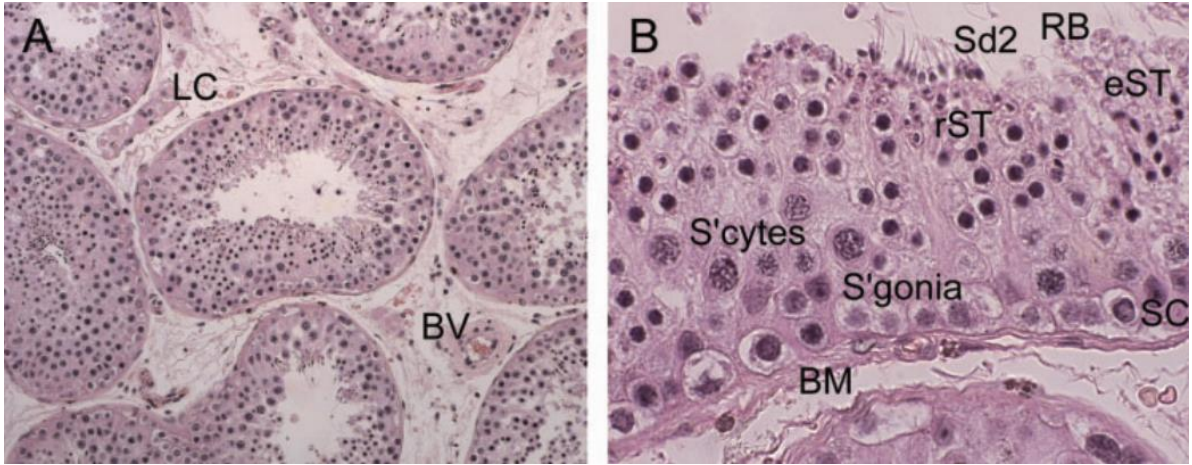


FIGURA 2: Espermatogénesis normal (A, $\times 10$; B, $\times 40$). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y todos los tipos de células están representados incluyendo células de Sertoli (SC), espermatogonia (S'gonia), espermatocitos (S'cytes), redondos (rST) y alargados (eST) espermátides. Las estructuras de la cola asociadas con las espermátidas Sd2 se ven claramente, al igual que los cuerpos residuales (RB). La membrana basal del túbulo (BM) se observa con el intersticio que contiene células de Leydig (LC), vasos sanguíneos (BV) y elementos fibrosos dispersos. (R.I.McLachlan, 2007).

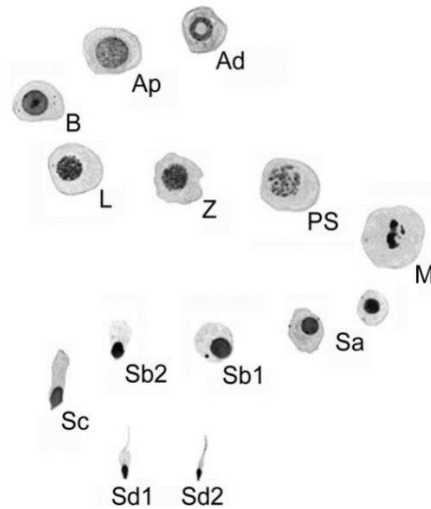


FIGURA 3. Espermatogénesis normal, los tipos de células. Este diagrama ilustra las características citológicas de los tipos principales de las células germinales dentro del epitelio seminífero. La estadificación de la espermatogénesis utiliza la descripción y clasificación utilizada por Clermont (1963). Ad, espermatogonia A, oscuro; Ap, espermatogonia A, pálido; B, espermatogonia B; L, espermatocito de leptoteno; Z: espermatocito de cigoteno; PS, espermatocitos de paquitenos; M, división meiótica, Sa–d, espermátides a–d. (R.I.McLachlan, 2007).

VALORACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

Es esencial para el observador que el tejido esté adecuadamente tratado y fijado de tal manera que todas las células del proceso de espermatogénesis sean fácilmente reconocibles. El patólogo debe ser capaz de reconocer los tipos individuales de células germinales, gracias al estudio de las características morfológicas individuales de estas. Con mucha frecuencia en la práctica clínica el valor de la biopsia testicular se ha subestimado como resultado de la pobre fijación o por el poco conocimiento del proceso de espermatogénesis por parte del patólogo. La formalina que es el fijador más frecuentemente usado en los departamentos de patología no debería ser usado para el tejido blando testicular porque puede provocar artefactos de encogimiento y dificultar la valoración de los diferentes tipos de células germinales. Como se mencionó anteriormente, se recomienda la solución de Bouin o fijadores similares (R.I.McLachlan, 2007; Rupert P. Amann, 2010).

El patólogo debe sistemáticamente evaluar y describir los siguientes aspectos:

- La uniformidad del tejido histológico, y si hay heterogeneidad, estimar la proporción del tejido con algún patrón histológico determinado.
- El diámetro de los túbulos seminíferos, la presencia del lumen y la presencia o ausencia de fibrosis.
- Evaluación de las células germinales presentes en el epitelio seminífero, específicamente tratando de identificar las espermatogonias, los espermatocitos primarios y las espermátides redondas y alargadas, representando los estadios 1 y 2 de Clermont. Se debe evaluar y comentar si hay alguna disminución leve, moderada o severa en el número de células germinales.
- Si la espermatogénesis se detiene en algún estadio específico el patólogo debe identificar en que estadio ocurre este arresto del desarrollo. El término arresto no debería usarse a menos que no haya progresión más allá de algún estadio en todos los túbulos de una biopsia.
- Se debe valorar la presencia de las células de Sertoli en el epitelio. Células de Sertoli pequeñas con nucléolo pequeños son descritas como inmaduras. El término síndrome de sólo células de Sertoli (SCOS) sólo debe usarse si todos los túbulos en una biopsia muestran una ausencia total de células germinales. Por lo tanto, cuando se encuentran túbulos que

sólo contienen células de Sertoli entremezclados con túbulos que contienen estadios avanzados de espermátides, el diagnóstico debe ser hipoespermatogénesis.

- Sí tanto las células germinales como las células de Sertoli están ausentes de los túbulos y hay fibrosis marcada y acumulación de un material hialino amorfo de tipo membrana basal, el término hialinización de túbulos seminíferos debe ser utilizado.
- El compartimento de espermatozonias del testículo debe ser cuidadosamente examinado para determinar sí hay células con hallazgos característicos de carcinoma in situ; y si están presentes determinar sí hay diseminación extra tubular.
- El tejido intertubular debe ser examinado para identificar la presencia de células de Leydig. La acumulación de las células de Leydig en grandes agregados o micro nódulos debe anotarse. Adicionalmente la presencia de algún aumento de macrófagos o alguna otra célula inflamatoria debe describirse. Esto último porque puede haber solamente infiltración focal como sucede alrededor de los túbulos con carcinoma in situ, o puede ser un proceso extenso inflamatorio como sucede en la orquitis granulomatosa.

Varios algoritmos para la interpretación de la biopsia testicular se han propuesto en las últimas 3 décadas. En general, muestran grandes variaciones en la evaluación cuantitativa y cualitativa de la espermatogénesis. Los tres sistemas de puntuación más citados son los de Johnsen (M Rashed, 2007), Levin, y Silber y Rodriguez-Rigau. El sistema Johnsen, es un sistema de clasificación histológico cuantitativo y ampliamente citado. Propone que, en por lo menos 100 túbulos seminíferos el nivel de maduración de los espermatozoides se califique entre 1 y 10, según la célula germinal más avanzada del túbulo. La cuenta total de Johnsen entonces es determinada dividiendo la cuenta total por el número de túbulos evaluados. Un enorme inconveniente del sistema de puntuación de Johnsen es que la puntuación media del túbulo puede no reflejar el verdadero estado de la espermatogénesis, por ejemplo: la espermatogénesis normal se puede encontrar en una biopsia junto a los túbulos con un patrón de solo células de Sertoli. Esto da lugar a una cuenta errónea que indicaría un disturbio severo de la espermatogénesis. (Dohle, 2012). Por lo tanto, el sistema de puntuación implica una valoración detallada, cuantitativa de los tipos de las células germinales y se considera demasiado laborioso para el uso clínico rutinario por la mayoría de los patólogos.

A pesar de sus defectos inherentes, la puntuación de Johnsen todavía se divulga extensamente, pero raramente según el detalle de su descripción original. Al abogar por su abandono (incluidas

las modificaciones propuestas por de Kretser y Holstein, 1976), se reconoce que existen limitados métodos sistemáticos disponibles y que, como consecuencia, los datos confusos e inconsistentes seguirán apareciendo mientras los autores "sigan su propio camino". La falta de descripción metodológica y validación requerida por las revistas contrasta con la rigurosa validación requerida para los ensayos endocrinos. (R.I.McLachlan, 2007)

Por último, el sistema propuesto por Levin es el sistema de clasificación más cualitativo, que implica el reconocimiento de ciertos patrones espermatogénicos que ocurren muy típicamente en los casos de infertilidad. Ningún método se considera el estándar, a pesar de la gran necesidad de un abordaje uniforme a la hora de interpretar la muestra de la biopsia del testículo.(Coopberg, 2005).

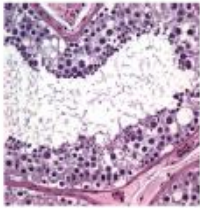
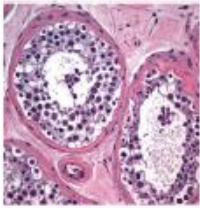
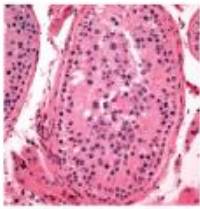
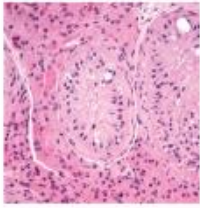
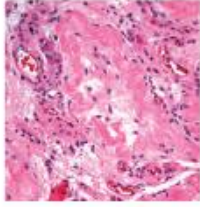
El uso de la metodología de identificación de patrones histológicos mencionada va a permitir la clasificación de las anormalidades de células germinales que van a tener impacto clínico en la toma de decisiones terapéuticas por parte de los especialistas en infertilidad masculina. Sin embargo, es esencial reconocer que ninguna de estas indica un mecanismo patogenético específico. Sí estas definiciones son aceptadas y utilizadas rutinariamente a la hora de valorar una biopsia testicular por infertilidad podríamos tener algún grado de claridad y será posible una comparación más precisa de los resultados en diferentes estudios.

PATRONES DE ESPERMATOGÉNESIS

A pesar de que existen varios sistemas de clasificación, la recomendación actual de la Asociación Europea de Urología, y la que es más ampliamente utilizada por la mayoría de las publicaciones científicas y libros de texto, para el reporte y clasificación de una biopsia testicular por infertilidad se basan cinco patrones histológicos de espermatogénesis, más un patrón mixto. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010) Estos patrones incluyen:

- Espermatogénesis normal
- Ausencia de túbulos seminíferos (hialinización de túbulos seminíferos)
- Presencia exclusiva de células de Sertoli (síndrome de solo células de Sertoli)
- Arresto de la maduración / Espermatogénesis incompleta
- Hipoespermatogénesis
- Patrones mixtos

Tabla 3: Clasificación de alteraciones de espermatogénesis humana. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

Diagnostic Classification	Histology (H&E, ×400)	Histologic Findings	Clinical Implications
Normal testicular biopsy		Complete spermatogenesis in the entire biopsy and the presence of normal inter-tubular tissue.	Usually associated with posttesticular causes of azoospermia and carries an excellent reproductive prognosis.
Hypospermatogenesis		All stages of spermatogenesis present but reduced to a varying degree. This includes the mixed pattern with some tubules showing Sertoli cells only or hyaline sclerosis with other tubules containing complete spermatogenesis.	In a series of 39 patients with hypospermatogenesis on testicular biopsy, MicroTESE was successful in retrieving sperm in 79% of these men. ⁹
Maturation arrest		Complete arrest at a particular stage, most often at the spermatogonial or primary spermatocyte stage. If rare spermatids are present focally, the lesion is best classified as severe hypospermatogenesis, rather than arrest.	In a series of 61 patients with maturation-arrest on testicular biopsy, testicular exploration can successfully identify sperm in these men. For men with pure early MA (maturation up to the level of the primary spermatocyte), the retrieval rate was 14.3%. For men with late MA (maturation from the secondary spermatocyte to immature spermatids), the retrieval rate was 46.1%. The retrieval rate for men with a mixed pattern (early and late MA or SCO with MA), the retrieval rates ranged from 26.7% to 47.5%. ^{3, 10}
SCO		Tubules contain only Sertoli cells, and there is complete absence of germ cells.	In a series of 373 patients with SCO on testicular biopsy, MicroTESE was successful in retrieving sperm in 45% of these men. Pregnancy rates with IVF/ICSI were approximately 50%. ¹¹
Seminiferous tubule hyalinization		Thickening of the peritubular membranes due to fibrosis and basement membrane-like material, with absence of intratubular germ cells and Sertoli cells.	The reproductive prognosis of patients with uniform seminiferous tubule hyalinization is very poor.

Abbreviations: H&E, hematoxylin-eosin; IVF/ICSI, in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection; MA, maturation arrest; MicroTESE, microdissection testicular sperm extraction; SCO, Sertoli-cell-only.

- Síndrome de solo células de Sertoli (SCOS)

El síndrome de sólo células de Sertoli también llamado como aplasia de células germinales se aplica cuando hay ausencia de células germinales en cualquier punto de la maduración, pero la arquitectura tubular se encuentra conservada y las células de soporte continúan presentes. A primera vista la imagen recuerda a un testículo en fase prepuberal. La etiología es desconocida en la mayoría de los casos. Para optimizar su valor clínico el término síndrome de sólo células de Sertoli debe estrictamente aplicarse al patrón donde no se observan células germinales en ninguno de los túbulos (Figura 3).

Este patrón no es indicativo de un proceso patológico común, siendo visto en infertilidad idiopática en asociación con microdeleciones en el cromosoma Y, como resultado de una orquitis, quimioterapia o radio terapia, o puede representar una anomalía embriológica de migración de células germinales desde la cresta gonadal.

El término "SCOS parcial" se utiliza a menudo cuando una proporción variable de túbulos muestran algún desarrollo de células germinales, incluso hasta la etapa de espermátides alargadas. Éste es un patrón relativamente común en la falla espermatogénica idiopática que puede evolucionar en un cierto plazo en un fenotipo puro de SCOS. Es importante reconocer esto como una variante de la hipoespermatogénesis, que lleva un mejor resultado para la recuperación de espermatozoides, contrario a el SCOS verdadero. (R.I.McLachlan, 2007)

En todos los casos las células de Sertoli están orientadas perpendicularmente a la membrana basal del túbulo seminífero y en la mayoría de los casos la túnica propia y la membrana basal tubular no muestran hialinización significativa y los túbulos son de aspecto normal o con una leve disminución en su diámetro. (Cristina Magi-Galluzzi, 2015). El intersticio contiene cantidad variable de células de Leydig.

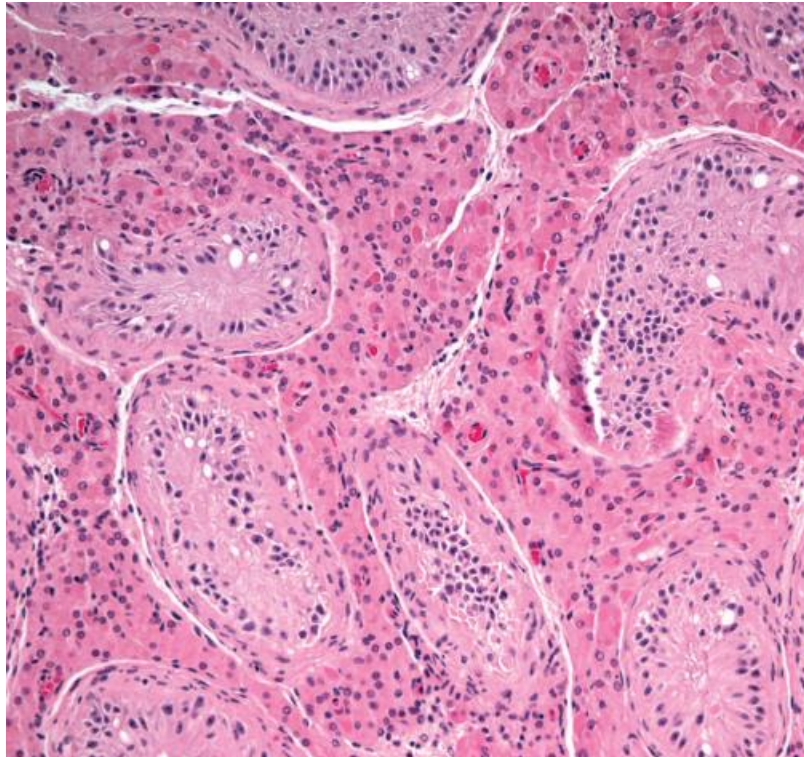


FIGURA 4. Síndrome de solo células de Sertoli. Los túbulos tienen un diámetro reducido, sin células germinales, y grandes células maduras de Sertoli. Hay una prominencia de las células de Leydig en el intersticio en esta biopsia de un paciente adulto con el síndrome de Klinefelter, aunque éste no sea un hallazgo específico (H&E, aumento original 3100). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

- Arresto de la maduración

Este término (alternativamente llamado arresto de células germinales o arresto espermatogénico), debe aplicarse cuando hay una interrupción completa de la espermatogénesis uniforme en todos los túbulos (Figura 5). El arresto es más frecuente observado a nivel de los espermatocitos primarios o las espermátides (Cristina Magi-Galluzzi, 2015), pero puede ocurrir en estadios más tempranos o tardíos. Debe de identificarse el arresto de la maduración de los espermatocitos de forma homogénea en todos los túbulos obtenidos en la biopsia. Este hallazgo es relativamente raro en tejido de biopsia, por lo que algunos aplican una definición mucho menos estricta y se refieren a los casos con maduración de espermátides focal, como maduración “incompleta o parcial” (R.I.McLachlan, 2007). Estos casos sin embargo es mejor clasificarlos como hipoespermatogénesis con patrón heterogéneo, que se describirá más adelante; con un pronóstico más favorable a la hora de realizar la TESE.

Generalmente los túbulos seminíferos tienen un diámetro reducido. No es usual que haya engrosamiento de la túnica propia o anomalías en el intersticio o las células de Leydig. (Cristina Magi-Galluzzi, 2015)

El arresto espermatogénico puede ocurrir a nivel de las espermatogonias en casos de insuficiencia de gonadotropina, o en estadios más avanzados de diferenciación en casos de daño a células germinales como consecuencia de quimioterapia o radioterapia. Las alteraciones en el emparejamiento de los cromosomas durante la meiosis es el factor etiológico causal más frecuente del arresto de la maduración en el estadio de espermatocitos. Un arresto reversible en el estadio de espermatocito primario puede deberse a daño térmico, infecciones, o factores hormonales y nutricionales, mientras que un arresto irreversible en los espermatocitos primarios o en estadio de espermátides es más frecuentemente relacionado a anomalías cromosómicas ya sea en células somáticas o en células germinales con los subsecuentes daños durante la meiosis. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

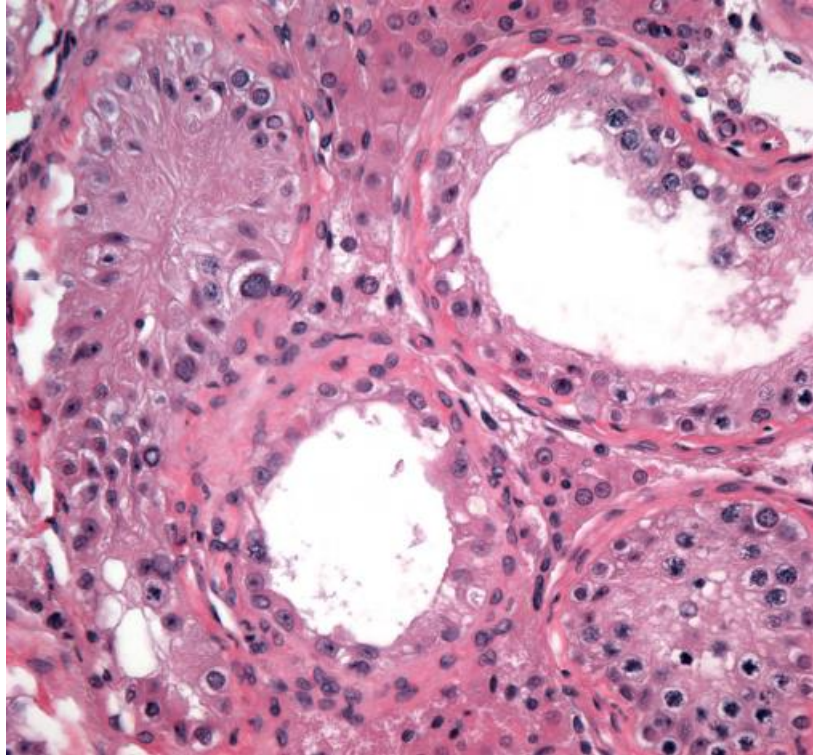


FIGURA 5: Arresto de la maduración. Las secciones muestran una variación en el diámetro tubular y luminal. Nótese la ausencia de espermátides maduras, mientras que los espermatocitos primarios siguen siendo prominentes (H&E, magnificación original 3400).

- Hipoespermatogénesis

El hallazgo de espermátides maduras en cualquier túbulo de una biopsia indica finalización del proceso de espermatogénesis, y es un criterio definitorio de la hipoespermatogénesis, un desorden en el cual la maduración ocurre, pero el número total de células germinales está disminuido. Este patrón puede ser uniforme a lo largo de los túbulos (Figura 6), pero es más frecuente que haya variabilidad entre los túbulos, incluyendo algunos con esclerosis extensa y otros con un patrón de sólo células de Sertoli. Es importante recordar que la espermatogénesis no aparece de manera completa en cada sección tubular en la mayoría de las biopsias, incluso en un testículo completamente normal. Otros hallazgos que ayudan a diferenciar la hipoespermatogénesis incluyen engrosamiento de la túnica propia con aumento en el depósito de colágeno y fibrosis intersticial, y un número aumentado de túbulos de pequeño calibre. Debido a estas alteraciones asociadas en la arquitectura, las células germinales en estadios más tempranos de diferenciación se pueden desprender y salir hacia el lumen, provocando una apariencia desorganizada. Las células de Leydig están presentes usualmente en cantidad adecuada. (Cristina Magi-Galluzzi, 2015).

Una gran variedad de causas puede inducir los cambios no específicos de hipoespermatogénesis irregular, incluyendo la diabetes mellitus, la presencia de un varicocele, toxinas, hipotiroidismo y alcoholismo entre otras etiologías. (Cristina Magi-Galluzzi, 2015)

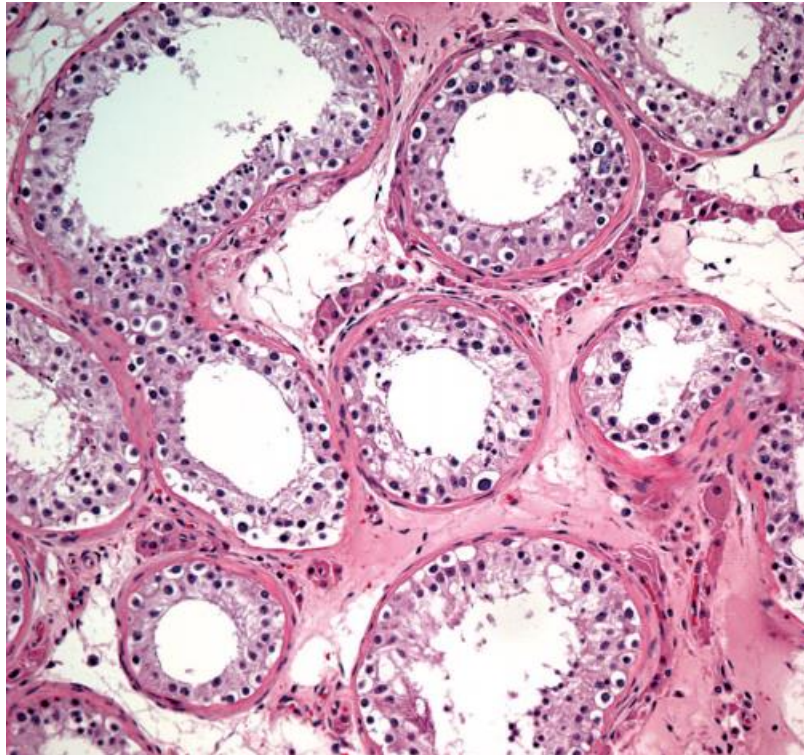


FIGURA 6: Hipoespermatogénesis. Las secciones muestran diámetros tubulares y lumbales variables reducidos y una reducción total de células germinales, pero todos pueden ser identificados, incluyendo espermátides maduras ocasionalmente. El examen de alta potencia puede ser necesario para observar la presencia de espermátides maduras, los núcleos de los cuales aparecen oscuros y angulados. Estos hallazgos se ven comúnmente en conjunción con túbulos escleróticos y /o túbulos que contienen sólo células de Sertoli (H&E, aumento original 3200).(Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

- Hialinización de túbulos seminíferos

También llamada como “testículo en etapa terminal” o “esclerosis tubular”, estas biopsias se caracterizan por una extensa hialinización intratubular y peritubular con ausencia de células germinales. Se pueden encontrar túbulos de aspecto normal pero no es lo usual. Este patrón se caracteriza y diferencia de los patrones mencionados anteriormente por su extensa hialinización que incluye a todos los túbulos de una biopsia. También es característica la ausencia de células de Sertoli, pero se pueden observar algunas células de Leydig persistentes en el intersticio tubular (Figura 6). En especímenes testiculares de biopsia estos hallazgos pueden ser el resultado de isquemia, infección o deficiencia adquirida de gonadotropinas (Cristina Magi-Galluzzi, 2015), aunque en la mayoría de los casos su agente causal no puede ser determinado. Este patrón puede también verse en adultos con el síndrome de Klinefelter, sin embargo, a estos pacientes no es necesario realizarles una biopsia testicular para diagnóstico. La expectativa de un paciente con fines de fertilidad con este tipo de hallazgo es pobre. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

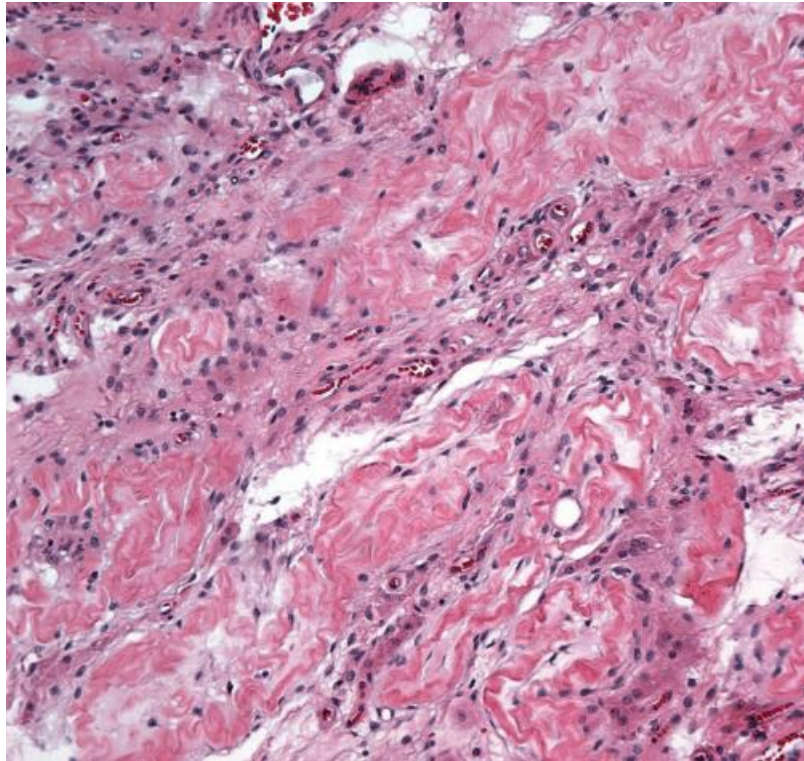


FIGURA 7: Atrofia y fibrosis. Los túbulos atróficos tienen una membrana basal gruesa y prominente, con un aspecto hialinizado que rodea un lumen borrado en gran parte por el tejido fibroso. Esta es la etapa final de un gran número de procesos que causan lesiones tubulares (H&E, aumento original 3200). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

- Patrones mixtos

Es más común encontrar patrones mixtos en la patología testicular que ejemplos puros. Es usual observar síndromes de solo células de Sertoli o túbulos hialinizados en un contexto de túbulos seminíferos con maduración normal o disminuida. Como se mencionó anteriormente este hallazgo debe categorizarse como hipoespermatogénesis con un porcentaje estimado de cada componente adicional. Un patrón heterogéneo excluye el diagnóstico de arresto de la maduración el cual debe ser uniforme en todos los túbulos. Un patrón mixto de túbulos hialinizados y túbulos con sólo células de Sertoli, mezclados con algunos túbulos compuestos por células de Sertoli inmaduras o prepuberales, se ha propuesto como una característica del síndrome de Klinefelter; pero, patrones similares también pueden verse en la aplasia de células germinales o en varicocele, por lo tanto, el diagnóstico del síndrome de Klinefelter no debería basarse únicamente en la biopsia testicular. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)

Una disminución en la función testicular ocurre normalmente con el proceso de envejecimiento caracterizado por cambios involutivos en el parénquima testicular, incluyendo hipo espermatogénesis, fibrosis peritubular u hialinización de túbulos, que dan como resultado un patrón que recuerda alguna patología testicular primaria mixta. Si bien unos cuantos túbulos esclerosados pueden ser compatibles con un testículo con un proceso normal de envejecimiento, áreas grandes o contiguas de esclerosis son sugestivas de algún proceso patológico. La maduración anormal de los espermatozoides, el desprendimiento de las células germinales en el lumen tubular la degeneración de células terminales y la acumulación intracelular de lípidos en las células de Sertoli con vacuolización citoplasmática son frecuentes.

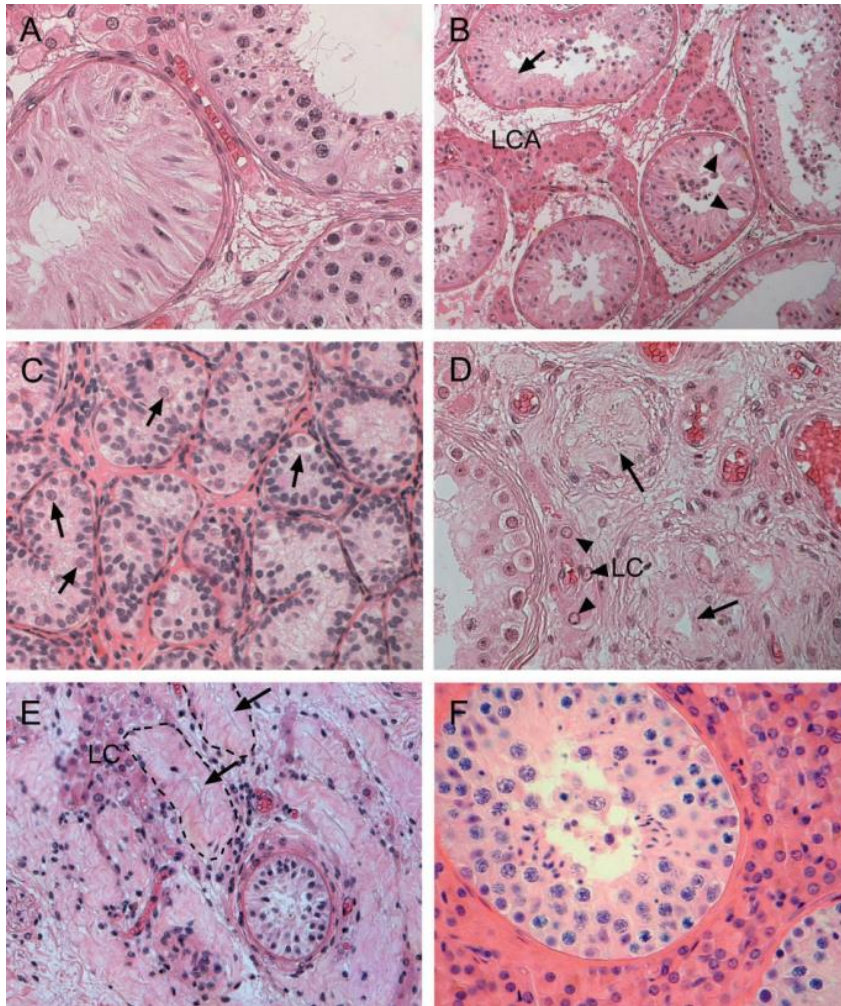


FIGURA 8: Fenotipos mixtos y características especiales. (A) La heterogeneidad de la espermatogénesis en biopsias de hombres con oligozoospermia se muestra con un túbulo revestido sólo por las células de Sertoli adyacentes a los túbulos que muestran espermatogénesis completa. Tal biopsia se debe categorizar como hipoespermatogénesis, pero, se debe agregar en los comentarios la presencia de túbulos con patrón de células de Sertoli solamente ($\times 25$). (B) Otro ejemplo de la apariencia heterogénea del epitelio seminífero asociado con el daño testicular. La flecha muestra una pérdida severa de células germinales, y en otras áreas (puntas de flecha) la vacuolización de las células de Sertoli está presente. Las agregaciones de células de Leydig (ACV) son visibles en el compartimento intersticial. ($\times 10$). (C) Un ejemplo de testículo inmaduro que muestra cordones seminíferos sin lumen y ocupados por gonocitos (flechas) y células inmaduras de Sertoli sin los nucleolos prominentes vistos en las células adultas de Sertoli. El tejido intertubular no contiene células de Leydig (LC) ($\times 10$). (D) Una imagen mixta de la detención de células germinales en la etapa de espermatogonia y túbulos que muestran la hialinización seminífera (flechas) a veces denominadas "túbulos fantasmas" y las células de Leydig intercaladas (puntas de flecha, LC) ($\times 25$). (E) El aspecto típico de una biopsia de un hombre con síndrome de Klinefelter que muestra hialinización de túbulos seminíferos (flechas), agregaciones del LC y de túbulos ocasionales con las células de Sertoli solamente. Este patrón no es diagnóstico del síndrome de Klinefelter y puede resultar de una gama de procesos patológicos ($\times 10$). (F) Una biopsia de un hombre con síndrome de Klinefelter que ilustra un túbulo con espermatogénesis completa rodeada por agregaciones del LC ($\times 25$). Todos los tejidos están fijados en fijador GR, excepto F, que se fija en el fijador de Cleland, y todos teñidos con. (R.I.McLachlan, 2007)

ABORDAJE PARA INTERPRETACIÓN DE LA BIOPSIA TESTICULAR

Inicialmente, la impresión a bajo poder debe orientarnos al grado de uniformidad de las características histológicas (Figura 9). Si se encuentra heterogeneidad, se puede dar una estimación de la proporción de tejido con un cierto patrón. A esta potencia es posible confirmar si el testículo parece inmaduro o maduro, una característica que puede ser comentada. El diámetro tubular también debe ser examinado, aunque rara vez es necesario medirlo. Una disminución del diámetro tubular se asocia al daño al epitelio tubular, que se puede evaluar más a fondo en alto poder. La observación a bajo poder es también útil para evaluar la presencia o la ausencia de edema intersticial, de fibrosis, de granulomas, o de inflamación, que se puede asociar a lesión secundaria al testículo del varicocele o de la orquitis. Los túbulos también deben evaluarse para detectar la presencia de displasia intratubular como una cuestión de rutina. Por último, el tejido intertubular debe examinarse a gran aumento para detectar la presencia o acumulación de células de Leydig.

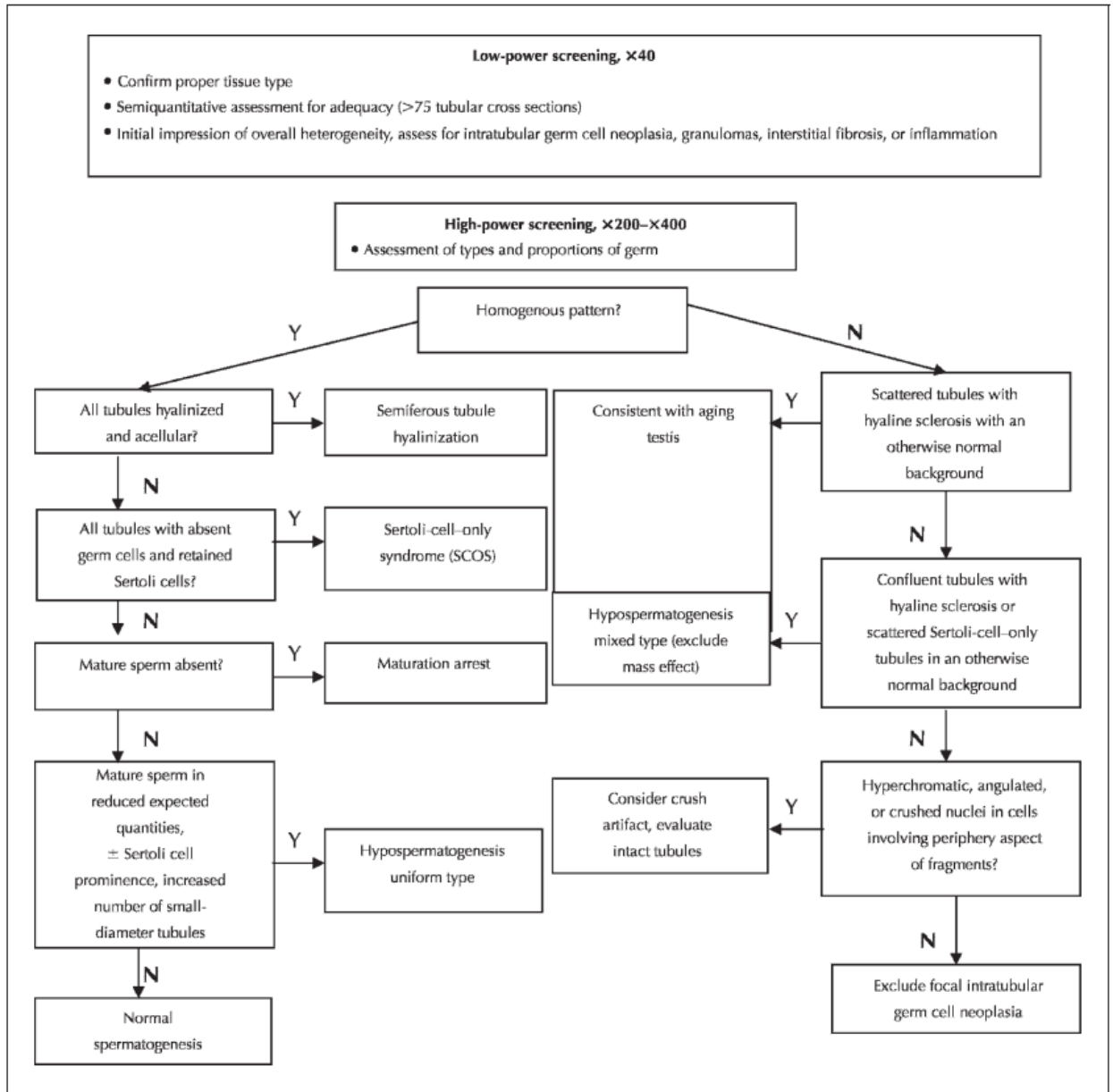
El examen a mayor acercamiento proporciona una evaluación de los tipos y proporciones de células germinales en los túbulos. La evaluación para la detención de la maduración requiere evaluar si la espermatogénesis procede a la diferenciación completa de las espermátides a través de los túbulos. Es más útil trabajar hacia atrás, evaluando la presencia de espermátides alargadas a través de los túbulos. Si están ausentes, se debe seguir el mismo procedimiento hacia atrás en busca de espermatoцитos y luego espermatogonias. De esta manera se permite que uno observe en qué nivel la diferenciación se detiene. La detención de células germinales solo debe diagnosticarse si no hay maduración más allá de una etapa inmadura en todos los túbulos presentes dentro de la biopsia. Si hay falta de diferenciación en algunos, pero no todos los túbulos, la cantidad de formas maduras debe ser observada y un comentario que refleje el patrón heterogéneo se debe hacer junto con una interpretación de hipoespermatogénesis. Una prominencia de las células de Sertoli, con una disminución total relativa de la cantidad de células germinales, se observa a menudo en asociación con hipoespermatogénesis también, y es la principal característica de diagnóstico cuando el desorden es uniforme. Cuando el desorden es heterogéneo, un patrón mezclado de túbulos en los cuales ocurre la maduración completa, junto con los túbulos adyacentes que contienen solamente las células de Sertoli o la esclerosis hialina, puede ser una pista para el diagnóstico.

El término síndrome de solo células de Sertoli se debe reservar para aquellos casos en los cuales todos los túbulos en la biopsia muestran la ausencia de células germinales; si algunos túbulos

contienen sólo células de Sertoli, pero otros túbulos contienen espermátides avanzadas, el diagnóstico general es la hipoespermatogénesis con un patrón mixto. Si las membranas basales tubulares están engrosadas y arrugadas, junto con el desarrollo ausente de las células germinales y lúmenes encogidos, el diagnóstico de hialinización tubular es obvia.

Los elementos importantes para comentar en el reporte incluyen la gravedad de la anomalía testicular, si está presente, y si el hallazgo es homogéneo o heterogéneo, por ejemplo: "hipoespermatogénesis leve a moderada con una reducción heterogénea de las espermátides maduras; con espermátides maduras identificadas focalmente." La interpretación clínica de este ejemplo implica claramente que el cultivo de espermatozoides para la inyección intracitoplasmática de espermatozoides tiene una alta probabilidad de éxito. Un diagnóstico de: "detención de la maduración identificada, con solo espermatocitos primarios presentes en todos los perfiles tubulares" implica una perspectiva mucho menos favorable para la recuperación de las espermátides. Las tasas exactas de recuperación para esta última condición son muy dispares debido a la variación en la aplicación del término detención de maduración, incluyendo a muchos casos con un fenotipo mixto (es decir, algunos túbulos con detención y otros con espermatozoides maduros). (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010).

Figura 9: Algoritmo diagnóstico para la interpretación de la biopsia testicular por infertilidad. (Lisa A. Cerilli, Wayne Kuang, & David Rogers, 2010)



CONCLUSIONES

- No existe un consenso mundial que estandarice el reporte de las biopsias testiculares por infertilidad masculina.
- El conocimiento del proceso de espermatogénesis es prerequisite para desarrollar conceptos útiles para la adecuada clasificación de los patrones histológico en la biopsia testicular por infertilidad.
- Se recomienda que el manejo de la infertilidad masculina implique a un patólogo experimentado, conocedor de los procesos relacionados con la espermatogénesis y alteraciones de células germinales, trabajando en asociación cercana con clínicos de la infertilidad.
- El abordaje estandarizado de la histología de la biopsia testicular por un patólogo experto puede contribuir a una caracterización adecuada de la misma que repercute en el diagnóstico adecuado del factor masculino y en el manejo clínico de los pacientes.
- El sistema de clasificación basado en el esquema de Levin es el más adecuado desde el punto de vista cualitativo y permite el reconocimiento de ciertos patrones espermatogénicos que ocurren típicamente en casos de infertilidad.
- La biopsia testicular ha sido durante años una de las herramientas cruciales en el diagnóstico y manejo de la infertilidad masculina.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Jungwirth, T. D. (2016). *EUA Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology.
2. Ahmet Gudeloglu, S. J. (2013). Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics*, 27-34.
3. Andreas Jungwirth, e. a. (2012). European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 324-332.
4. Angelo Carpi, A. A. (2011). Percutaneous biopsy of the testicle: A mini review with a proposal flow chart for non-obstructive azoospermia. *Annals of Medicine*, 83-89.
5. Angelo Carpi, F. G. (2005). Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia: safety and diagnostic performance. *Fertility and Sterility*, 1029-1033.
6. Arighno Das, J. A.-B. (2020). Sperm retrieval success and testicular histopatology in idiopathic nonobstructive azzospermia. *Asian Journal of Andrology*, 555-559.
7. CM., P. (1987). The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. *Seminars in diagnostic pathology*, 264-274.
8. Coopberg, M. C. (2005). Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 673-677.
9. Cooper, T. G. (2010). *WHO Laboratory manual for the examination and procesing of human semen*. Geneva: World Health Organization.
10. Cristina Magi-Galluzzi, H. S. (2015). Nonneoplastic Diseases of the Testis. In C. M.-G. Ming Zhou, *Genitourinary Pathology* (pp. 562-569). Philadelphia: Elsevier Saunders.
11. Dohle, G. R. (2012). Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian Journal of Andrology*, 88-93.
12. G.R. Dohle, W. W. (2004). *Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology.

13. Gerald Puhse, J. H. (2011). Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications. *Human Reproduction*, 2606-2612.
14. Gianmartin Cito, e. a. (2018). Novel method of histopathological analysis after testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 170-176.
15. Gnessi, L. (2018). Testicular histopathology, semen analysis and FSH, predictive value of sperm retrieval: supportive counseling in case of reoperation after testicular sperm extraction (TESE). *BMC Urology*, 1-8.
16. Hans Ivar Hanevik, M. B. (2010). Improved Diagnostic Accuracy of Testicular Biopsies for Infertility Through Simplified Criteria and a Dedicated Pathologist. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 214-218.
17. Hideyuki Kobayashi, K. N. (2012). Focus Issue on Male Infertility. *Advances in Urology*, 1-6.
18. HS., L. (1979). Testicular biopsy in the study of male infertility: its current usefulness, histologic techniques and prospects for the future. *Human Pathology*, 569-584.
19. Hui Dai Lee, H. S. (2012). Causes and classification of male infertility in Korea. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 172-175.
20. Ishikawa, T. (2009). Serum hormones in patients with non obstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction. *Urology Journal*, 1495- 1499.
21. J.V. Medrano, A. M.-M. (2010). Comparative analysis of the germ cell markers C-KIT, SSEA-I and VASA in testicular biopsies from secretory and obstructive azoospermias. *Molecular Human Reproduction*, 811-817.
22. Kirichock, Y. (2010). Acid extrusion from Human Spermatozoa is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell*, 327-337.
23. Kiyomi Matsumiya, I. M. (1994). New indication of testis biopsy for azoospermia: a clinical study in Japanese patients. *International Journal of Pathology*, 177-180.
24. Lisa A. Cerilli, M., Wayne Kuang, M., & David Rogers, M. (2010). A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1197-1204.

25. M Rashed, N. R. (2007). Patterns Of Testicular Histopathology In Men With Primary Infertility. *The Internet Journal of Urology*, 1-9.
26. Manuel Nistal, R. P. (2020). Nonneoplastic Diseases of the Testis. In G. T. Liang Cheng, *Urologic Surgical Pathology* (pp. 640-658). Philadelphia: Elsevier.
27. McKenney, J. K. (2018). Genitourinary Pathology Testis and Testicular Adnexa. In e. a. John R. Goldblum, *Rosai and Ackerman`s Surgical Pathology* (pp. 1136-1138). Philadelphia: Elsevier.
28. Medicine, A. S. (2015). Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *AMSR Pages*, 18-25.
29. Medicine, A. S. (2018). Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *ASRM Pages*, 777-782.
30. Mills, S. E. (2012). *Histology for Pathologists*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
31. Monika E. Beliveau, P. J. (2011). The value of testicular "mapping" in men with non-obstructive azoospermia. *Asian Journal of Andrology*, 225-230.
32. Noveski, P. (2015). MicroRNA expression profiles in testicular biopsies of patients with impaired spermatogenesis. *Andrology*, 1020-1027.
33. Penzias, A. (2020). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *ASRM Pages*, 533-535.
34. R.I.McLachlan, E.-D. M. (2007). Histological evaluation of the human testis - approaches to optimizing the clinical value of the assesment: Mini review. *Human Reproduction*, 2-16.
35. Rammou-Kinia, R. (1999). Fine needle aspiration of the testis. Correlation between cytology and histology. *Acta Cytologica*, 991-998.
36. Richard A. Schoor, S. E. (2002). The role of testicular biopsy in the modern managment of male infertility. *The Journal of Andrology*, 197-200.
37. Rupert P. Amann, e. a. (2010). *Handbook of Andrology*. New Hampshire: The American Society of Andrology.

38. Sidney Glina, J. B. (2005). Testicular histopathology diagnosis as a predictive factor for retrieving spermatzoa for ICSI in non-obstructive azoospermic patients. *Clinical Urology*, 338-341.
39. Solís, L. G. (2015, Setiembre 11). Autorización para la realización de la técnica de reproducción asistida de fecundación in vitro y transferencia embrionaria. *La Gaceta*, pp. 6-10.
40. Speroff L., F. M. (2006). *Endocrinología Ginecológica Clínica y Esterilidad*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
41. Tomomoto Ishikawa, e. a. (2004). Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest. *BJU International*, 1314-1316.
42. Wen-Hao Tang, S.-J. Z.-D.-Y. (2018). A clinical trial on the consistency of bilateral testicular tissue histopathology and Johnsen score: single side or bilateral side biopsy. *Oncotarget*, 23848-23859.