

Niños nacidos de técnicas de reproducción asistida con espermatozoides no procedentes de eyaculado

M. Victoria Hurtado de Mendoza, Antonio L. González-Utor, Rocío Díaz, Olga Cascales, Javier Alonso, Salvador Fernández y Pedro Gutiérrez

Laboratorio de Fecundación in Vitro. CEHISPR. Clínica Al-Andalus. Sevilla. España.

RESUMEN

Introducción: El objetivo de este trabajo se centra en aportar nuestra experiencia en técnicas de reproducción asistida (TRA) con espermatozoides no procedentes de eyaculado y seguimiento de los niños nacidos. Ésta, evidencia la necesidad de actualizar el anexo I de la Ley 14/2006 de 26 de mayo, incluyendo este tipo de técnicas.

Métodos: Estudio retrospectivo de 80 ciclos correspondientes a 57 parejas. La patología masculina se clasificó como: azoospermia no obstructiva (13); azoospermia obstructiva (35) y aneyaculación (9). Los espermatozoides obtenidos por aspiración epididimaria, testicular o biopsia testicular se criopreservaron como paso previo al ciclo de fecundación in vitro-microinyección intracitoplásmica. Tras la descongelación se procedió a tratamiento enzimático en los casos de espermatozoides testiculares, y posterior activación de la motilidad con pentoxifilina in situ. Se valoraron las tasas de fecundación, implantación, embarazo evolutivo, aborto, gestaciones simples y múltiples. Para conocer los datos obstétricos y desarrollo evolutivo de los niños nacidos se realizó una encuesta telefónica a las parejas que quedaron gestantes.

Resultados: De 80 ciclos se obtuvieron 947 ovocitos; la tasa de fecundación fue del 60,2%. La tasa de embarazo global fue del 46,2% por ciclo y del 63,7% por paciente. La tasa de implantación fue del 26%. Se criopreservaron 130 embriones. En 23 ciclos de criotransferencia, la tasa de gestación fue del 21,7% por ciclo y del 33,3% por paciente. La tasa de aborto clínico global fue del 19,1%. La encuesta reunió información del 84,2% de los casos, donde un total de 44 niños nacieron de 31 partos. En general, las parejas contestaron que sus niños son sanos y presentan un buen desarrollo.

Conclusión: La implantación del empleo de espermatozoides no procedentes del eyaculado en el laboratorio es una técnica rutinaria más, con buenos resultados y nacimiento de niños sanos, siempre y cuando se realicen los estudios previos que requiere cada caso.

Palabras clave: Biopsia testicular. Pentoxifilina. ICSI. Recogida de espermatozoides.

ABSTRACT

Children born after ARTs with non-ejaculated spermatozoa

Introduction: The objective of this study is to report our experience in ARTs with non-ejaculated sperm and follow-up of the children born. These results show the need to update the appendix I of the Law 14/2006, 26th of May, which includes these types of techniques.

Methods: Retrospective study on 80 cycles for 57 couples. Male pathology can be classified into: obstructive azoospermia (OA) (35); non-obstructive azoospermia (NOA) (13); Anejaculation (9). Sperm obtained by epididymal aspiration or testicular biopsy were cryopreserved before the FIV-ICSI cycle. After thawing, it was enzyme treated (in cases of testicular sperm), and subsequent activation of motility with pentoxifylline "in situ". Fertilisation, implantation, pregnancy progress, abortion, single and multiple gestations were evaluated. For information about the obstetric and evolutionary development of children born a telephone survey was carried out on couples who were pregnant.

Results: From the 80 cycles, and 947 oocytes obtained, the fertilisation rate was 60.2%. From these, 196 embryos were transferred and 130 embryos were cryopreserved. The overall pregnancy rate was 46.2% and 63.7% per cycle per patient. The implantation rate was 26%. In freeze-thaw cycles, 44 embryos were transferred in 23 cycles; the pregnancy rate was 22.7% per cycle and 33.3% per patient. The overall abortion rate was 19.1%. In general, couples replied that their children were healthy and were developing well.

Conclusions: The introduction of using non-ejaculated sperm in the laboratory is a routine technique, with good results and the birth of healthy children, as long as previous studies are carried out on each case.

Key words: Testicular biopsy. Pentoxifylline. ICSI. Spermatozoa collection.

Correspondencia: Dra. M.V. Hurtado de Mendoza.
Laboratorio de Fecundación in Vitro.
Clínica Al-Andalus. Avda. Reino Unido, 1. 41012 Sevilla. España.
Correo electrónico: victoria.hurtadom@ono.com

INTRODUCCIÓN

La aprobación de la Ley 14/2006 de 26 de mayo¹ nos llenó de perplejidad al leer el anexo I, ya que no se reconocen técnicas de reproducción asistida (TRA) que son de práctica normalizada en los centros de reproducción. Específicamente nos referimos al empleo de espermatozoides obtenidos de epidídimo (punción-aspiración de epidídimo, PESA, MESA) o testículo (punción-aspiración percutánea testicular, TESA; biopsia abierta, TESE) ya sea en fresco o tras su criopreservación –descongelación y empleo en la microinyección intracitoplásmica (ICSI)–. Con anterioridad, en la Ley 35/1988 de 22 de noviembre² y sus posteriores modificaciones (modificaciones 1996³ y Ley 45/2003 de 21 de noviembre⁴) no se especificaba la procedencia de los espermatozoides para su uso en las TRA. Sin embargo, en el anexo I al que nos referimos, se indica que en las TRA se emplearán “espermatozoides de eyaculado”, lo cual dejaría a las técnicas mencionadas fuera de las aceptadas para fecundación in vitro (FIV), requiriendo permisos y tutela como técnicas experimentales. Además, se sanciona la práctica de cualquier técnica que no esté recogida en el mencionado anexo I.

A nuestro juicio, no creemos que se trate de técnicas experimentales, ya que se llevan realizando de forma regular hace años, con resultados publicados muy positivos tanto en el ámbito nacional como internacional⁵⁻¹⁰.

Objetivo

Nos proponemos aportar nuestra experiencia en TRA con espermatozoides no procedentes de eyaculado y valorar el desarrollo de los niños nacidos.

MÉTODOS

Se ha llevado a cabo un estudio retrospectivo de 57 parejas que han realizado 80 ciclos de FIV-ICSI, con unas patologías masculinas que se diferenciaron en: azoospermias no obstructivas (ANO); azoospermias obstructivas (AO); aneyaculación (ANEY). Todos los procesos para la obtención de espermatozoides se realizaron inicialmente antes de la estimulación ovárica. El tejido testicular se procesó por disgregación mecánica con agujas de insulina 0,33 × 12,7 mm. Una vez confirmada la presencia de espermatozoides, las muestras se criopreservaron de acuerdo al protocolo de rutina, diluidas vol/vol con TEST Yolk Buffer (Irvine Scientific, USA) y se introdujeron en pajuelas de 0,25 ml. La criopreservación se realizó en máquina de

congelar programable (Nicoolbag MS21) con una rampa de enfriamiento de temperatura ambiente a –2,0 °C/min hasta –50 °C y, finalmente, inmersas en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó el test posdescongelación con una pajuela testigo para valorar la supervivencia de los espermatozoides descongelados. La estimulación ovárica, la punción folicular y la preparación de los ovocitos para FIV-ICSI se realizó de acuerdo al método estándar. El día de la punción folicular, previa a la ICSI, se descongeló a temperatura ambiente el número de pajuelas adecuado y se procedió a su tratamiento enzimático con colagenasa y ADNsa¹¹ o el método que fuese más conveniente¹². Tras centrifugar la muestra en microcentrífuga, se resuspendió el *pellet* en un volumen final de 20 µl. Una vez preparada la placa de ICSI, se realizó la activación in situ añadiendo pentoxifilina (5 mM) (Hemovas, Lab. Roberts, España) directamente en la gota de medio sin PVP, donde previamente se había añadido un pequeño volumen del *pellet*. Dado que la activación de la motilidad espermática se produce en 2 o 3 min, no es necesaria la incubación u otras condiciones especiales^{13,14}. Los espermatozoides activados nadaron a la interfase medio-aceite donde fueron capturados y trasladados a la gota de PVP de lavado. Al espermatozoide seleccionado se le quebró la cola y tras varios lavados se llevó a cabo la microinyección del óvulo según técnica convencional¹⁷.

Los ovocitos inyectados fueron examinados 16 h más tarde para comprobar su fecundación. La calidad embrionaria se catalogó según criterio ASEBIR¹⁵ en 4 categorías teniendo en cuenta los tiempos de observación (D+2: 44-47 h; D+3: 67-71 h), el número de células y ritmo de división, la tasa de fragmentación, la semejanza de tamaño de las blastómeras, el grado de multinucleación, el aspecto del citoplasma y la zona pelúcida. Así, distinguimos embriones tipo A: de alta calidad con máxima capacidad de implantación; B: buena calidad con elevada capacidad de implantación; C: regular con una probabilidad de implantación media; D: mala calidad con probabilidad de implantación baja.

Las transferencias fueron realizadas en D+2 o D+3, según los criterios rutinarios de nuestro laboratorio. Los embriones sobrantes de buena calidad fueron criopreservados. Los embriones de pobre pronóstico pasaron a cultivo prolongado, y si no llegaban a estado de blastocisto se desecharon en D+6.

La gestación se consideró positiva tras observar mediante ecografía el número de sacos gestacionales con latido cardíaco, 6 semanas después de establecer el embarazo bioquímico.

Dado que nuestras pacientes, una vez confirmada su gestación, se remiten a su ginecólogo, para recabar

información acerca de datos obstétricos, neonatales y de desarrollo evolutivo, se les realizó una encuesta telefónica para que respondieran a una serie de preguntas (semanas de gestación; datos acerca del parto; peso y sexo [cálculo de la ratio] de los niños nacidos; incidencias neonatales; necesidad de incubadora; enfermedades o anomalías detectadas; desarrollo en la escuela; etc.).

RESULTADOS

Se realizaron 80 ciclos correspondiente a 57 parejas, con una edad media de la mujer de $33,5 \pm 0,66$ años, no se realizó ninguna selección en función de la patología femenina. La patología masculina se clasificó en:

- Grupo 1, ANO: 13 pacientes con completa o incompleta parada madurativa, completa o incompleta aplasia de células germinales (Céls. Sertoli Solo) y esclerosis y atrofia tubular. Ninguno de los casos fue S. Klinefelter.
- Grupo 2, AO: 35 pacientes, de los cuales la mitad correspondía a vasectomías.
- Grupo 3, ANEY: 9 pacientes con problemas de eyaculación.

Se obtuvieron 947 ovocitos, de los cuales 737 fueron microinyectados, y se obtuvo una tasa de fecundación global del 60,2%. El desarrollo embrionario en D+2 fue de un 98,1%, donde un 57,8% corresponde a embriones de buena calidad (categorías A+B) y en D+3 un 88,6% de los embriones seguía evolucionando y el 41,3% era de buena calidad (categorías A+B) (fig. 1). Se transfirieron una media de $2,45 \pm 0,79$ embriones/transferencia, y se obtuvo una tasa de embarazo del 46,2%/ciclo y del 63,7%/paciente. La tasa de implantación fue del 26%. En el estudio del seguimiento de los niños nacidos se han incluido las gestaciones ob-

tenidas de embriones criopreservados (tabla 1). Se criopreservaron 132 embriones (32%), y en 23 ciclos realizados se transfirieron 44 embriones con una media de $1,91 \pm 0,66$ embriones por ciclo, con una tasa de embarazo del 21,7% y una tasa de implantación de 11,3%.

Los resultados respecto a tasa de embarazo, gestación, según patología masculina, se recogen en la tabla 2. La mayor tasa de embarazo se obtuvo en AO y las gestaciones múltiples fueron elevadas en los 3 grupos. En cuanto a la tasa de abortos, fue más elevada en ANO (si bien el número de casos fue pequeño).

Los datos recopilados tras la encuesta telefónica se exponen en la tabla 3. Comprende las edades de 8

TABLA 1. Resultado de los ciclos de embriones congelados/descongelados

Ciclos descongelación	
Número de pacientes	15
Número de ciclos	25
Número de ciclos anulados	2
Número de embriones descongelados	55
Número supervivientes > 50% (%)	42 (76,3)
Número de embriones transferidos ($x \pm DE$)	44 ($1,91 \pm 0,66$)
Embarazo (ciclo) (pacientes)	5 (21,7%) (33,3%)
Tasa de implantación	11,3% (5/44)

DE: desviación estándar.

TABLA 2. Resultados de embarazo y nacimiento en función de la patología masculina

	ANO	AO	ANEY
Embarazo, n (%) / ciclo	9 ^a (47,3)	33 ^a (68,7)	5 (38,4)
Aborto, n (%)	3 (33,3)	5 (15,1)	1 (20)
Nacimientos, n ^b	6	22	4
Simples, n	5	12	2
Gemelares, n (%)	1 (20)	10 (45,4)	2 (50)

ANEY: aneyaculación; ANO: azoospermia no obstructiva; AO: azoospermia obstructiva.

^aSe incluye embarazos de TEC.

^bDatos recogidos a partir de la encuesta.

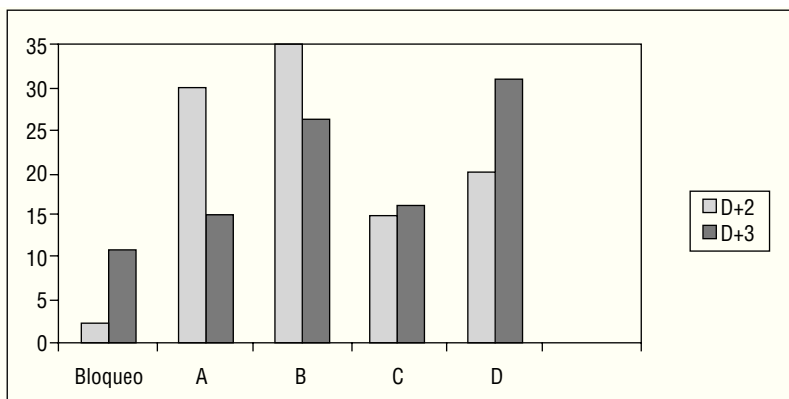


Figura 1. Calidad embrionaria expresada según catalogación embrionaria ASEBIR. Calidad embrionaria expresada en porcentaje. Bloqueo: no división; A: embrión óptimo; B: buena calidad, fragmentación < 25%; C: embrión regular (asimetría, vacuolas escasas, anomalías de la zona pelúcida y fragmentación < 35%); D: embrión de mala calidad (criterio ASEBIR, 2007).

TABLA 3. Datos obstétricos

	ANO	AO	ANEY
<i>Edad gestacional x (semanas)</i>			
Simple	39,6 (39-40)	39,5 (37-41)	40
Gemelares	38	36,3 (35-38)	36,5 (35-38)
<i>Nacimientos pretérmino</i>			
Simple, n	—	—	—
Gemelares, n	—	5	1
<i>Peso al nacimiento</i>			
Simple, n (x ± DE)	5 (3.746 ± 525 g) (2.890-4.330 g)	12 (3.260,4 ± 134,7 g) (2.530-3.950 g)	1 (3.200 g)
Gemelares n (x ± DE)	1 (2.500-2.150 g)	9 (2.393,5 ± 97,6 g) (1.500-3.050 g)	2 (2.366,6 ± 200 g) (2.050-2.740 g)
<i>Bajo peso (< 2.500 g)</i>			
Simple, n (%)	—	—	1*
Gemelares, n (%)	1	13	1
Muerte intrauterina	—	—	1 (embrión gemelar)
Muerte neonatal temprana	—	1 (embrión gemelar)	—
Incubadora	—	4 (1.500-2.225 g)	1 (2.050 g)*

*Gestación gemelar que perdió un varón a los 7 meses.

ANEY: aneyaculación; ANO: azoospermia no obstructiva; AO: azoospermia obstructiva; DE: desviación estándar.

años a 12 meses. Respecto al sexo de los niños se detectó una ratio baja, del 41,9%, para varones (número de varones/número varones + hembras). Los nacimientos con bajo peso (< 2.500 g) se dieron en las gestaciones gemelares, no observándose muy bajo peso (< 1.500 g) en ninguno de los grupos. Se produjo una muerte intraútero en un caso de ANEY, un feto procedente de embarazo gemelar (varón de 7 meses), y una muerte neonatal en un caso de AO, una niña, procedente de un embarazo gemelar. Se registró un 15,6% de nacimientos pretérmino (antes de las 37 semanas de edad gestacional). En cuanto a la necesidad de incubadora sólo 5 niños recurrieron a ella, 4 niños nacidos de casos de AO y 1 de ANEY.

En ninguno de los casos consultados se apreciaron malformaciones mayores. Por lo que respecta a las malformaciones menores, no fueron concluyentes, se detectó un caso de sufrimiento fetal donde se sospechó un problema renal pendiente de estudio (caso de ANO); un segundo caso donde se sospechó soplo cardíaco no confirmado (caso gemelar, AO), y un tercer caso en el que se detectó un problema de oído pendiente de estudio (AO). En general los niños son sanos, con buen desarrollo psicomotor, adaptación escolar y sin mayores incidencias.

DISCUSIÓN

La Ley de reproducción asistida 14/2006 de 26 mayo¹, se “olvidó” de recoger en su anexo I el empleo de espermatozoides procedentes de epidídimo o testículo. Esto dio pie a un revuelo y perplejidad entre

los profesionales que trabajamos con las TRA. Ante la posibilidad de que estas técnicas pasasen a ser experimentales, se decidió realizar este estudio retrospectivo sobre ciclos de FIV-ICSI en los que se emplearon espermatozoides no procedentes de eyaculado, para valorar nuestra experiencia y recoger información acerca del desarrollo de los niños nacidos por estas técnicas.

Desde 1993¹⁶, estas técnicas están bien implantadas en los laboratorios de reproducción asistida, con trabajos publicados tanto en el ámbito nacional como en el internacional^{7-10,17-22}.

Nuestros resultados, comparados con la bibliografía, están normalizados en cuanto a tasa de fecundación, desarrollo embrionario, tasa de embarazo e implantación. Si bien, el bajo número de casos no permite establecer comparaciones con base estadística, nuestros resultados coinciden con los de otros trabajos en que la tasa de embarazo de AO es normalizada y la de ANO es inferior, debido en parte a su propia patología²³.

La encuesta realizada a los padres telefónicamente, con las limitaciones que ello conlleva, permitió reunir datos del 84,2% de las gestaciones obtenidas. Dado que hay muy pocos trabajos acerca del desarrollo de los niños nacidos que distingan grupos dentro del uso de espermatozoides no procedentes de eyaculado, en este estudio las causas de azoospermia se separaron en 3 grupos (AO, ANO, ANEY). Si bien el bajo número de casos por grupo no permitió realizar tratamiento estadístico, cabe destacar la tendencia hacia una baja edad gestacional en todas las gestaciones. Uno de los primeros datos que arroja el estudio es el elevado número de gestaciones gemelares en todos los grupos.

La alta incidencia de embarazos múltiples, que en este estudio es más elevada en el grupo AO. Los problemas asociados a las gestaciones múltiples están relacionados con la prematuridad (18,7%), bajo peso (34%) y mortalidad, en nuestro trabajo se registra una muerte intraútero y una muerte posnatal.

Respecto al sexo de los niños nacidos llama la atención a la baja ratio del 41,9% para varones (número de varones/número varones + hembras) en el grupo de AO, que es el que mayor número de nacimientos registra. Estos datos coinciden con los recientemente presentados por Fedder et al²⁴ en este mismo año, que como bien puntualizan los autores, no es posible saber actualmente la razón de esta baja ratio, una posible causa puede ser el empleo de células germinales inmaduras.

No se han detectado malformaciones mayores –entendiendo por malformaciones mayores las que causan impedimento funcional o requieren intervención quirúrgica, o ambas–. Respecto a malformaciones menores, éstas están sin confirmar o pendientes de estudio. Los trabajos publicados coinciden en que las malformaciones congénitas en niños de ICSI empleando espermatozoides de epidídimo y testículo, no aparecen con una frecuencia mayor que en los niños nacidos por FIV o concepción natural. Sin embargo, dentro de las malformaciones congénitas en niños de ICSI, éstas se detectan específicamente en el sistemas urogenital, donde destacan las hipospadias²⁴.

En general, la información recogida en este estudio nos indica que los niños con edades comprendidas entre los 8 años y 12 meses son sanos, con buen desarrollo psicomotor, adaptación escolar, y en los rangos de peso y talla para su edad. Si bien es cierto que los niños en general presentan un buen desarrollo, es necesario enfatizar la importancia de hacer un buen cribado paterno. Informar pertinentemente a los pacientes acerca del riesgo de transmitir aberraciones cromosómicas, de los cromosomas sexuales y de novo, así como los posibles problemas de fertilidad⁶. Se recomienda la realización de diagnóstico genético preimplantacional en todos estos casos límite²⁵. Sería deseable realizar seguimiento evolutivo de los niños nacidos por estas técnicas y recoger los datos, tanto en el ámbito nacional como internacional, para corroborar su validez.

El “olvido” en la Ley sobre la utilización de espermatozoides no procedentes de eyaculado dejó a muchas parejas afectadas con este problema con las puertas cerradas. El revuelo ocasionado llevó a la Federación de Asociaciones para el Estudio de la Reproducción a realizar una reclamación al Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC) para hacerle ver la realidad clínica, demanda de pacientes y que el empleo de espermatozoides no procedentes de eyaculado reúne las garantías de seguridad y eficacia que justificaría

su inclusión en la ley. Pero dado que la tramitación del cambio en la Ley, con rango de real decreto, conllevaría un período muy largo, el MSC y la Comisión Nacional de Reproducción Asistida emitieron un documento en el que se considera una práctica provisional tutelada siempre que la autoridad sanitaria competente la autorice. Resumiendo, la técnica está bien implantada en los laboratorios, los resultados son satisfactorios y aunque la salud de los niños nacidos no parece verse comprometida de forma significativa, queda pendiente el elaborar estudios de seguimiento del desarrollo de los niños nacidos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Cherola Sillero su colaboración en archivos.

Bibliografía

1. Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE núm. 126; 27 de mayo de 2006: 19947-56.
2. Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre técnicas de reproducción asistida. BOE núm. 282; 24 de diciembre; corrección de errores en BOE núm. 284; 26 de noviembre de 1988: 33373-8.
3. Real Decreto 412/1990. Establece los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida. BOE núm 72; 23 de marzo de 1996: 11256.
4. Ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida. BOE núm. 126; 27 de mayo de 2006 Sec. 1: 19947-56.
5. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Liebaers I, Van Steirteghem A. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. Hum Reprod. 1996;11 Suppl 4:131-55; discussion 156-9.
6. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem AC, et al. A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. Hum Reprod. 1998;13 Suppl 1:196-207.
7. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Treatment of severe male infertility by micromanipulation-assisted fertilization: news and views. Frontiers in Bioscience. 1998;3:E238-46.
8. Gil-Salom M, Romero J, Mínguez Y, Molero MD, Remohi J, Pellicer A. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a chance of fertility in nonobstructive azoospermia. J Urol. 1998;160:2063-7.
9. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Mol Cell Endocrinol. 2000;169:15-9.
10. Gil Salom M. Spermatic recovery techniques for intracytoplasmic spermatozoid injection (ICSI) in male infertility. Arch Esp Urol. 2004;57:1035-46.
11. Crabbe E, Verheyen G, Silber S, Tournaye H, Van de Velde A, Goossens A, et al. Enzymatic digestion of testicular tissue may rescue the intracytoplasmic sperm injection cycle in some patients with non-obstructive azoospermia. Hum Reprod. 1998;13:2791-96.
12. Hurtado de Mendoza MV, Colls P, González-Utor AL, Cruz N, Gutiérrez P, Cascales F, et al. Modificaciones en la obten-

- ción de espermatozoides viables en casos límite de ICSI. *Actualidad Andrológica*. 1999;7:52-6.
13. Hurtado de Mendoza MV, González-Utor AL, Cruz N, Gutiérrez P, Cascales F, Silero JM. In situ use of pentoxifylline to assess sperm viability in ICSI treatment to cases with total lack of sperm movement. *Fertil Steril*. 2000;74:176-7.
14. González-Utor AL, Hurtado de Mendoza MV, Cascales O, Cruz N, Sánchez D, Zamorano M, et al. Pentoxifylline: an effective tool for ICSI with testicular sperm. 19th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*. 2003;18 Suppl 1:152-3.
15. Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Herrero R, Figueroa MJ, Moreno JM, et al. Cuadernos de embriología clínica. II Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: ASEBIR; 2007.
16. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993;342:1237.
17. Dohle GR, Ramos L, Pieters MH, Braat DD, Weber RF. Surgical sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection as treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1998;13: 620-3.
18. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Janssenswillen C, Staessen C, Verheyen G, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13 Suppl 1:134-42.
19. Tarlatzis BC, Bili H. Intracytoplasmic sperm injection. Survey of world results. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:336-44.
20. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Westlander G, Wikland M, Wood M. Obstetric outcome of pregnancies following ICSI, classified according to sperm origin and quality. *Hum Reprod*. 2000;15:1189-94.
21. Van Perperstraten AM, Proctor ML, Phillipson G, Johnson NP. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(4): CD002807.
22. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JW. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2004;82:691-701.
23. Vernaev V, Tournaye H, Osmanagapglu K, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. Intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with non-obstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2003;79:529-33.
24. Fedder J, Gabrielsen A, Humanidan P, Erb K, Emst E, Loft A. Malformation rate and sex ratio in 412 children conceived with epididymal or testicular sperm. *Human Reprod*. 2007; 22:1080-5.
25. Soini S, Ibarreta D, Anastasiadou V, Aimé S, Braga S, Cornet M, et al. The interference between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *European Journal of Human Genetics*. 2006;14:588-645.