

Evaluación de la eficacia de los laboratorios de embriología y anatomía patológica en el análisis de las biopsias testiculares de pacientes azoospermicos

Evaluation of the Efficacy of the Laboratories of Embryology and Pathological Anatomy in the Analysis of Testicular Biopsies of Patients with Azoospermia

Gustavo Frattini^{1,2}, Yamila Pirovano¹, Mayra Gómez Vitolo¹, Andreina Césari⁴, Pablo E. Meretta³, Alicia Pené¹

¹Centro Especializado en Reproducción Asistida y Genética Humana (CRECER). ²Clínica Privada Pueyrredón. ³Inst. de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), CONICET y Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP). ⁴Instituto de Investigación Biológica-CONICET y UNMDP. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Objetivos: El propósito de este estudio es evaluar la eficacia de los laboratorios de embriología y de anatomía patológica para hallar espermatozoides en las muestras de tejido testicular obtenido por biopsia testicular (*testicular sperm extraction*, TESE) en pacientes con azoospermia no obstructiva.

Materiales y métodos: Se realizó un análisis retrospectivo y prospectivo de todos los pacientes con azoospermia no obstructiva atendidos en CRECER y en la Clínica Privada Pueyrredón, entre enero de 2006 y diciembre de 2016. En este estudio solo se incluyeron aquellos pacientes en los que la muestra obtenida con TESE fue enviada simultáneamente al anatomopatólogo y al laboratorio de embriología. Para el análisis de los resultados de las biopsias el estudio se detuvo a fines de 2016, pero el seguimiento de los pacientes continuó hasta el mes de octubre de 2017, registrándose todos aquellos casos que realizaron procedimientos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) con muestras obtenidas de TESE y se anotó la obtención de embriones, embarazos y nacimientos.

Resultados: El laboratorio de embriología halló espermatozoides en 36 de los 68 pacientes (52,9%), mientras que el laboratorio de patología solo informó presencia en 21 pacientes (30,88%). Hubo acuerdo en el hallazgo de espermatozoides entre ambos laboratorios en 20 de los 68 casos (29,41%), mientras que en 16 pacientes el laboratorio de embriología encontró espermatozoides donde el de patología no pudo hacerlo (23,53%). Al mismo tiempo, el laboratorio de patología halló espermatozoides solo en un caso en el que el de embriología informó su ausencia para la misma muestra analizada (1,47%) ($p=0,0003$).

Conclusiones: El laboratorio de embriología es significativamente más eficaz para determinar la presencia de espermatozoides en las muestras de TESE, teniendo mejor rendimiento que el de patología, por lo que consideramos que, si las muestras fueran analizadas solo por el patólogo, se perdería la posibilidad de lograr muchos embarazos realizando ICSI más TESE.

PALABRAS CLAVE: Azoospermia, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI), biopsia testicular (TESE).

Objectives: The purpose of this study is to evaluate the efficacy of embryology and pathological anatomy laboratories to find spermatozoa in testicular tissue samples obtained by testicular sperm extraction (TESE) in patients with non-obstructive azoospermia.

Materials and methods: It was carried out a retrospective and prospective analysis of all the patients with non-obstructive azoospermia treated at CRECER and at Clínica Privada Pueyrredón, between January 2006 and December 2016. This study only includes patients in whom the sample obtained with TESE was sent at the same time to the pathology and embryology laboratory. For the analysis of the results of the biopsies, the study was stopped at the end of 2016, but the follow-up of the patients continued until October 2017, registering all those cases that performed intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with samples obtained from TESE and wrote down the patients who've got embryos, pregnancies, and births.

Results: The embryology laboratory found sperm in 36 of the 68 patients (52.9%), while the pathology laboratory only reported presence in 21 patients (30.88%). There was agreement in the finding of sperm between both laboratories in 20 of the 68 cases (29.41%), while in 16 patients the embryology laboratory found sperm where the pathology department could not do so (23.53%). At the same time, the pathology laboratory found sperm only in one case in which the embryology department reported its absence for the same sample analyzed (1.47%) ($p=0.0003$).

Conclusions: The embryology laboratory is significantly more efficient to determine the presence of sperm in the samples of TESE, having better performance than the pathology one. Taking into account that, we believe that if the samples are only analyzed by the pathologist, the possibility of getting many pregnancies performing ICSI plus TESE would be lost.

KEYWORDS: Azoospermia, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), testicular sperm extraction (TESE).

INTRODUCCIÓN

Se estima que la azoospermia, definida como la ausencia de espermatozoides en, al menos, dos espermogramas con centrifugado de la muestra, se presenta en aproximadamente el 1% de la población general. Esta cifra representa entre el 10% y el 15% de los diagnósticos en pacientes con infertilidad masculina¹⁻³.

Desde la aparición de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) en 1992, se abrió un nuevo horizonte para estos pacientes brindándoles la posibilidad de concebir obteniendo espermatozoides testiculares para su microinyección en el ovocito⁴.

Por este motivo, optimizar los métodos diagnósticos para establecer la presencia de espermatozoides testiculares es una tarea *prioritaria* en la andrología, no solo en la forma de extraer la muestra, sino también en el proceso adecuado para evaluar la misma.

Se han descrito diversas técnicas para la recuperación de espermatozoides testiculares, una de ellas es biopsia testicular (*testicular sperm extraction*, TESE), donde la muestra se obtiene a través de una pequeña biopsia realizada en ambas gónadas⁵⁻⁸.

El propósito de este estudio es evaluar la eficacia de los laboratorios de embriología y de anatomía patológica para hallar espermatozoides en las muestras de tejido testicular obtenido por TESE en pacientes con azoospermia no obstructiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un análisis retrospectivo y prospectivo de todos los pacientes atendidos en el Centro Especializado en Reproducción Asistida y Genética Humana (CRECER) y en la Clínica Privada Pueyrredón de la ciudad de Mar del Plata, a quienes se les realizó una biopsia testicular diagnóstica (TESE) como consecuencia del hallazgo de azoospermia no obstructiva en dos muestras de semen (aun después de centrifugadas), en el período comprendido entre enero de 2006 y diciembre de 2016. Los datos se recolectaron en fichas a través del análisis de las historias clínicas de ambos centros médicos.

Para el propósito de este estudio se incluyeron para el análisis solo aquellos pacientes en los que

la muestra de tejido testicular obtenida con TESE fue enviada simultáneamente para su estudio al anatomopatólogo de la Clínica Privada Pueyrredón, donde se efectuaron las biopsias, y al laboratorio de embriología de CRECER.

Si bien para el análisis de los resultados de las biopsias el estudio se detuvo a fines de 2016, el seguimiento de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se continuó hasta el mes de octubre de 2017, registrándose todos aquellos casos que realizaron procedimientos de ICSI con muestras obtenidas de TESE. Se anotó en ellos la obtención de embriones, embarazos y nacimientos.

TESE se realizó en todos los casos en forma ambulatoria, bajo sedación, extrayendo material suficiente de la porción medial y anterior de ambas gónadas, separando la muestra en dos partes iguales para ser enviada a los dos laboratorios (patología y embriología) al mismo tiempo. Ninguno de los laboratorios estuvo informado del resultado obtenido por el otro.

Las muestras remitidas al laboratorio de anatomía patológica fueron enviadas en fijador de Bouin, y las que recibió el laboratorio de embriología fueron colocadas en medio HTF modificado estéril (Irvine Scientific cat. 90126), suplementado con 0,3 mg de albúmina sérica humana (HTFm+HSA).

El laboratorio de patología procesó las muestras en forma diferida, mientras que el de embriología lo hizo en el momento, utilizando la siguiente técnica:

El tejido testicular se dispuso en una cápsula de 60 x 15 mm a 37 grados centígrados y se lo disgregó con la ayuda de dos portaobjetos inmersos en HTFm. El medio fue luego centrifugado a 300 rpm/min por 10 minutos y el pellet fue resuspendido en 0,5 ml de HTFm antes de observarlo con el microscopio. El laboratorio de patología utilizó el *score* de Johnsen para evaluar las muestras remitidas.

Ambos laboratorios informaron la presencia o ausencia de espermatozoides, y en el caso del de embriología se anotó también si éstos estaban móviles y el tipo de motilidad que presentaban.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa StatsDirect Statistical Software 3.0.198, aplicándose la prueba de Chi cuadrado (X^2) de proporciones apareadas

(McNemar) con un nivel de confianza de 95%. Para el cálculo del intervalo de confianza se utilizó el test exacto de Clopper-Pearson.

Todos los pacientes incluidos en este estudio firmaron un consentimiento informado para autorizar la realización del procedimiento quirúrgico y su inclusión en los protocolos de investigación clínica.

RESULTADOS

En el período comprendido entre 2006 y 2016 se efectuaron 96 biopsias testiculares (TESE) a los pacientes de entre 22 y 61 años de edad que consultaron por infertilidad de pareja con diagnóstico de azoospermia.

De este grupo, 68 pacientes cumplieron con el criterio de inclusión de haber enviado la muestra en forma simultánea para ser analizada por los laboratorios de patología y embriología, por lo que solo estos 68 casos fueron objeto del presente análisis.

En el análisis realizado por ambos laboratorios se hallaron espermatozoides en 37 de los 68 casos (54,4%). El laboratorio de embriología halló espermatozoides móviles en 36 de los 68 pacientes (52,9%), mientras que el laboratorio de patología solo informó presencia de espermatozoides en 21 pacientes (30,88%) dentro del mismo grupo observado (valor de p para las pruebas X^2 de proporciones apareadas de McNemar y exacta de Liddell = 0,0003 (1 DF) (Tabla 1).

Laboratorios	Embriología		Total de pacientes
	Pos (+)	Neg (-)	
Patología	Pos (+)	1	21
	Neg (-)	31	47
Total de pacientes		36	68

Tabla 1. Laboratorio de embriología versus anatomopatología.

Se realizó una prueba de McNemar y test exacto de Liddell para una tabla de valores apareados, con un Chi cuadrado (X^2) no corregido = 13,235294 (1 DF) $p=0,0003$ y un intervalo de confianza de 95%. Los casos de pacientes positivos para el laboratorio de embriología fueron 36 (52,9%), con un intervalo de confianza de 40-65%. Los casos de pacientes positivos para el laboratorio de anatomopatología fueron 21 (30,9%), con un intervalo de confianza de 20-43%.

Hubo acuerdo respecto del hallazgo de espermatozoides entre ambos laboratorios en 20 de los 68 casos (29,41%), mientras que en 16 pacientes el laboratorio de embriología encontró espermatozoides donde el de patología no pudo hacerlo (23,53%). Al mismo tiempo, el laboratorio de patología halló espermatozoides solo en

un caso en el que el de embriología informó su ausencia para la misma muestra analizada (1,47%).

Puede decirse que, en términos absolutos, el rendimiento del laboratorio de embriología fue un 22% superior al de patología.

Si se considera exclusivamente el grupo de los 37 pacientes donde se informó presencia de espermatozoides en la muestra testicular, la discrepancia en favor del laboratorio de embriología fue del 43,24% (solo 16/37 casos fueron informados como positivos por el laboratorio de patología en este grupo) (Figura 1).

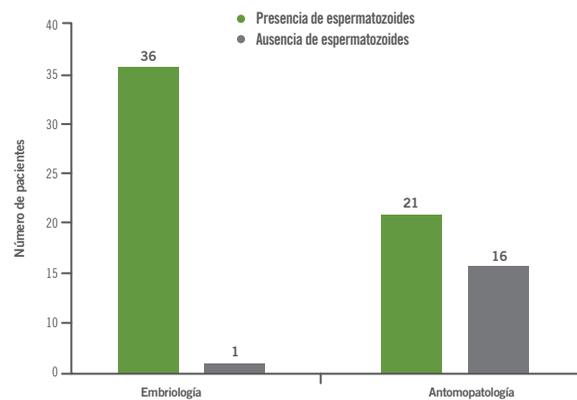


Figura 1. Hallazgos de espermatozoides del laboratorio de embriología versus laboratorio de anatomopatología

En el seguimiento realizado posteriormente a este grupo hasta el 2017, de los 37 pacientes donde se hallaron espermatozoides, 15 realizaron procedimientos de ICSI más TESE. Cuatro de ellos se encontraban en el grupo donde el laboratorio de embriología halló espermatozoides, mientras que el de patología no pudo hacerlo.

En los 4 casos mencionados en el párrafo anterior se obtuvieron embriones y dos de ellos consiguieron embarazo con niños nacidos a término.

DISCUSIÓN

El hallazgo de espermatozoides cercano al 50% en pacientes azoospermicos (54,4% en nuestra serie) se correlaciona con los datos reportados en la literatura⁹⁻¹¹.

Si bien microTESE parece ser la mejor técnica para la obtención de espermatozoides, la elección del método para recolectar la muestra testicular estuvo basada en que TESE proveía un mayor volumen de tejido para analizar, que pudiera ser dividido en partes iguales para enviarse a ambos laboratorios en forma simultánea⁹.

En pacientes con azoospermia no obstructiva la espermatogénesis puede ser focal dentro del testículo. Este hecho puede dar lugar a resultados variables en las biopsias realizadas dependiendo del sitio de toma de la muestra. Muchos autores, como Hauser y colaboradores, defienden la práctica de biopsias mapeadas por este motivo^{12,13}. En el caso de nuestra serie, la espermatogénesis focal no puede ser la causa de la diferencia entre los laboratorios, ya que la muestra se obtuvo de un solo sitio y fue dividida en partes iguales para ser enviada simultáneamente a ambos.

Aunque en nuestro análisis no se halló ningún carcinoma in situ testicular incidental, autores como Olesen y colaboradores¹⁴ han reportado una incidencia del mismo en el 2,2% de las 453 biopsias por azoospermia que realizaron. Por este motivo, si bien el laboratorio de embriología es superior en el hallazgo de espermatozoides, consideramos que, si es posible, la muestra debería ser observada también por un anatomopatólogo.

En el presente estudio hemos demostrado que, al menos en nuestra serie, el laboratorio de embriología fue un 22% más eficaz que el de anatomía patológica en el momento de determinar la presencia de espermatozoides cuando se realizó una biopsia diagnóstica.

Estos resultados difieren parcialmente de los hallados por Medel y colaboradores en 2005, quienes reportan una concordancia entre el laboratorio de embriología y el de anatomía patológica en el 85,3% de los 34 pacientes azoospermicos que evaluaron. A diferencia de nuestro estudio, el grupo de Medel no centrifugó la muestra procesada por el laboratorio de embriología. A pesar de ello, los autores hallaron espermatozoides en el 64,7% de sus pacientes (10% más que en la serie analizada aquí). El mismo centro había reportado en 2001 una discordancia entre los laboratorios en el 20% de los casos, porcentaje similar al encontrado en este estudio, y recomendaba ofrecer nuevas oportunidades a pacientes con biopsias previas negativas, si estas fueron analizadas por el anatomopatólogo. Es posible que estas discordancias se deban a lo reducido de la muestra de ambos grupos^{15,16}.

No hemos encontrado en este estudio un motivo que explique la discrepancia en los resultados de ambos laboratorios, aunque tal vez la razón radique en la diferente forma en que se procesan las muestras.

Bernie y colaboradores⁹ reportan una heterogeneidad en el modo de procesar las muestras obtenidas por TESE y otros métodos. Lo mismo informa la revisión realizada por Dohle y colaboradores¹³, quienes manifiestan que la extensa variación en la clasificación de la espermatogénesis por parte de los patólogos limita el valor pronóstico y diagnóstico de la biopsia testicular.

El *score* de Johnsen es muy difundido para el análisis anatomopatológico de las muestras testiculares¹⁷. En él se evalúan 100 túbulos seminíferos, que pueden no reflejar la realidad de toda la gónada, tal como se ha observado; lo que deriva en mejores resultados para el laboratorio de embriología al procesar la muestra completa que se le envía.

Jezek y colaboradores¹⁸, a diferencia de lo reportado aquí, encontraron una buena correlación entre los distintos puntajes del *score* de Johnsen y la posibilidad de hallar espermatozoides en TESE.

En el estudio de Schulze y colaboradores¹⁹, quienes compararon los resultados de la biopsia testicular y TESE en 250 hombres azoospermicos, se observa que hubo presencia de espermatozoides en el análisis realizado por el laboratorio de embriología (>10 por HPF) en un 20% de los casos donde el anatomopatólogo no pudo identificarlos. Su tasa de detección de espermatozoides con TESE en azoospermia fue del 62,8%. En sus conclusiones los autores recomiendan realizar siempre una evaluación conjunta por los laboratorios de patología y embriología en la biopsia diagnóstica.

Resultados similares pueden encontrarse en los artículos de Okada y colaboradores²⁰, Ramasamy y colaboradores²¹ y Tsujimura y colaboradores²², donde se reporta el hallazgo de espermatozoides entre el 6% y el 75% de los pacientes diagnosticados histológicamente como síndrome de Sertoli solo o arrestos en la maduración. En estas series, el microTESE fue superior al TESE convencional en la obtención de espermatozoides.

Creemos que son necesarios estudios prospectivos más amplios basados en hipótesis de trabajo claras para corroborar nuestros resultados y los de otros

autores, a fin de establecer normativas para el manejo de la azoospermia.

CONCLUSIONES

De los hallazgos obtenidos en este estudio pueden desprenderse las siguientes conclusiones:

- ♦ En los casos de azoospermia, aproximadamente la mitad de los pacientes presentan espermatozoides al realizárseles biopsias testiculares.
- ♦ El laboratorio de embriología es significativamente más eficaz para determinar la presencia de espermatozoides en las muestras de TESE, teniendo mejor rendimiento que el de patología.
- ♦ De acuerdo con lo expresado en el punto anterior, si las muestras fueran analizadas solo por el patólogo, se perdería la posibilidad de lograr muchos embarazos realizando ICSI más TESE.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010. 5th ed.
2. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril*. 2006 Sep; 86 (3): 516-23.
3. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol*. 1989 Jul; 142 (1): 62-5.
4. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul 4; 340 (8810): 17-8.
5. Stahl PJ, Stember DS, Goldstein M. Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med*. 2012; 63: 525-40
6. Coward RM, Mills JN. A step-by-step guide to office-based sperm retrieval for obstructive azoospermia. *Transl Androl Urol*. 2017 Aug; 6 (4): 730-44.
7. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2007 Nov-Dec; 13 (6): 539-49.
8. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl*. 2012 Jan; 14 (1): 82-7.
9. Bernie AM, Mata DA, Ramasamy R, Schlegel PN. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015 Nov; 104 (5): 1099-103.e1-3.
10. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1997 Jul; 12 (7): 1488-93.
11. Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1998 Nov; 13 (11): 3075-80.

12. Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, y cols. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia—is it necessary? *Hum Reprod.* 1998 Nov; 13 (11): 3081-5.
13. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl.* 2012 Jan; 14 (1): 88-93.
14. Olesen IA, Høi-Hansen CE, Skakkebaek NE, Petersen JH, Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N. Testicular carcinoma in situ in subfertile Danish men. *Int J Androl.* 2007 Aug; 30 (4): 406-11; discussion 412.
15. Medel P. Comparison between laboratory findings and histological diagnosis in TESE from men with non-obstructive azoospermia. Proceedings of the 8th International Congress of Andrology. Monduzzi Ed., Bologna, 2005.
16. Osés RJ, Bisioli C, Tiverón M, Medel P, Quintana R, Marconi G. Correlation between testicular sperm extraction (TESE) and biopsy results performed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. *Fertility and Sterility.* 2001 Sep; 76 (3) Suppl 1: S140.
17. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970; 1 (1): 2-25.
18. Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod.* 1998 May; 13 (5): 1230-4.
19. Schulze W, Thoms F, Knuth UA. Testicular sperm extraction: Comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod.* 1999 Sep; 14 Suppl 1: 82-96.
20. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Hara I, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 2002 Sep; 168 (3): 1063-7.
21. Ramasamy R, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval. *J Urol.* 2007 Apr; 177 (4): 1447-9.
22. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K, y cols. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod.* 2002 Nov; 17 (11): 2924-9.