

# Evaluación de parámetros con valor predictivo para la recuperación espermática en la biopsia testicular de pacientes con azoospermia

Yamila Pirosanto,<sup>1</sup> Gustavo Frattini,<sup>1, 2</sup> Andreina Césari,<sup>4</sup> Pablo Ezequiel Meretta,<sup>3</sup> Alicia Pené<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Especializado de Reproducción Asistida y Genética Humana (CRECER).

<sup>2</sup> Clínica Privada Pueyrredón.

<sup>3</sup> IIMyC-Instituto de Investigación Marina y Costera, Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica y Universidad Nacional de Mar del Plata.

<sup>4</sup> Instituto de Investigación Biológica. Consejo Nacional de Investigación Científica Técnica (CONICET) y Universidad Nacional de Mar del Plata.

Ciudad de Mar del Plata, Argentina.

Reproducción 2018;33(2):09-16

## Resumen

Proponemos la evaluación del poder predictivo de parámetros clínicos y bioquímicos de pacientes, azoospermicos como predictores del hallazgo de espermatozoides en una biopsia testicular. Asimismo analizaremos si en esas biopsias existe correlación entre los hallazgos anatomopatológicos y los del laboratorio de embriología. **Metodología.** Se incluyeron 68 pacientes entre 22 y 61 años, atendidos en CRECER, entre los años 2006 y 2016. Se analizaron antecedentes clínicos, datos físicos, hormonales y el hallazgo de espermatozoides en biopsia testicular por técnica abierta. **Resultados.** Para la hormona FSH, el análisis arrojó un valor de AUC: 0,756 y un valor de corte: 15,85 mUI/ml. El volumen testicular mostró un valor de AUC: 0,743 y un valor de corte: 15,50 ml. Para el índice IFT, el valor de AUC fue 0,723 y el valor de corte: 2,5. Finalmente,

se demostró que existe diferencia entre los hallazgos del análisis histológico y los resultados del laboratorio de embriología ( $p \leq 0,05$ ). **Conclusión.** Podemos suponer que la hormona FSH, el volumen testicular y el índice IFT son buenos parámetros a considerar cuando se trata a un paciente azoospermico. Asimismo, el laboratorio de embriología demostró ser más eficaz en la detección de espermatozoides.

**Palabras claves.** Esterilidad, azoospermia, TESE.

## Evaluation of parameters with predictive value for sperm retrieval in testicular biopsy of patients with azoospermia

### Summary

We propose the evaluation of the predictive power of clinical and biochemical parameters of azoospermic patients as predictors of sperm finding in a testicular biopsy. We will also analyze if in these biopsies there is a correlation between the anatomopathological vs. embryology laboratory findings. **Methodology.** 68 patients were included between 22 and 61 years, attended in CRECER, between the years 2006 and 2016. Clinical antecedents, physical and hormonal data and the sperm finding in testicular biopsy by open technique were analyzed. **Results.** For the

**Correspondencia:** Gustavo Frattini  
Correo electrónico: gustavofrattini@gmail.com

*FSH hormone, the analysis showed an AUC value of 0.756 and a cut-off value: 15.85 mIU/ml. The testicular volume showed a value of AUC: 0.743 and a cut-off value: 15.50 ml. For the IFT index, the AUC value was 0.723 and the cut-off value: 2.5. Finally, it was demonstrated that there is a difference between the findings of the histological analysis and the results of the embryology laboratory ( $p \leq 0.05$ ).*

**Conclusion.** *We can assume that the FSH hormone, testicular volume and the IFT index are good parameters to consider when treating an azoospermic patient. Also, the embryology laboratory proved to be more effective in detecting sperm.*

**Key words.** *Sterility, azoospermia, TESE.*

## Introducción

Diferentes estudios sugieren que la infertilidad masculina afecta aproximadamente al 7% de los hombres,<sup>1</sup> entre ellos, los pacientes azoospermicos. Esto implica la ausencia de espermatozoides en el semen después de una evaluación del fluido seminal en el microscopio, centrifugado en al menos dos ocasiones.<sup>2-4</sup>

El origen o las causas de la azoospermia pueden dividirse en tres categorías principales: pretesticular, testicular y posttesticular.

La azoospermia pretesticular se produce cuando el hipotálamo y la glándula pituitaria no funcionan correctamente para estimular los testículos normales en términos de función gonadal. La azoospermia testicular ocurre cuando el hipotálamo y la hipófisis funcionan normalmente, pero existe un defecto en el proceso de espermatogénesis. Como las estructuras ductales reproductivas están presentes, tanto la azoospermia pretesticular como testicular pertenecen a la subclase de "azoospermia no obstructiva". Por el contrario, la azoospermia posttesticular es el resultado de una obstrucción del flujo espermático en cualquier nivel del sistema de transporte, desde la red testicular hasta los conductos eyaculadores. Este tipo de azoospermia constituye la subclase de "azoospermia obstructiva".<sup>5</sup>

Aproximadamente del 10 al 15% de la infertilidad del factor masculino está asociada a la azoospermia, y casi dos tercios de los pacientes presentan azoospermia no obstructiva.<sup>1,6</sup> La azoospermia

no obstructiva puede ser causada por alteraciones hormonales, problemas genéticos, adquiridos o físicos.

Desde que se introdujo el TESE (extracción de espermatozoides testiculares)<sup>7</sup> en combinación con ICSI, las parejas azoospermicas que presentan espermatozoides testiculares viables<sup>8,9</sup> tuvieron la oportunidad de concebir sus propios hijos.<sup>10,11</sup>

La tasa de éxito de TESE (extracción de espermatozoides testiculares) en pacientes azoospermicos es del 40% al 60%.<sup>12</sup> Sin embargo, es un procedimiento invasivo y puede causar una serie de complicaciones.

Estudios previos han demostrado la relación que existe entre la histología testicular y los resultados de fertilidad para pacientes azoospermicos sometidos a ICSI.<sup>13</sup> Vinay et al.<sup>14</sup> indican que hay elementos que deben tenerse en cuenta para describir las condiciones clínicas de los pacientes azoospermicos de una manera más precisa. Sin embargo, el valor predictivo de los parámetros convencionales asociados con la espermatogénesis, incluida la hormona FSH, el volumen testicular y la histología testicular individual no siempre especifican los pacientes que lograrán recuperar los espermatozoides a través de TESE y los que no lo harán.

Con base en lo anterior, el presente estudio propone evaluar el poder predictivo de los parámetros clínicos y bioquímicos de pacientes con azoospermia para la recuperación exitosa de espermatozoides mediante TESE. Además, analizará si existe alguna relación entre los hallazgos anatomopatológicos de las biopsias realizadas a pacientes azoospermicos y los hallazgos de esas mismas muestras examinadas "in vivo" en el laboratorio de reproducción.

## Material y métodos

### Pacientes

Se realizó un análisis retrospectivo y prospectivo entre 2006 y 2016 de todos los hombres diagnosticados con azoospermia que fueron atendidos en el Centro Especializado de Reproducción Asistida y Genética Humana (CRECER) y en la Clínica Privada Pueyrredón en la ciudad de Mar del Plata.

Para el propósito de este estudio, se incluyeron 68 pacientes azoospermicos que habían recibido

un examen biológico y anatomopatológico de la muestra de biopsia testicular. Los pacientes tenían entre 22 y 61 años de edad en el momento de la biopsia. 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.

### Diseño del estudio

Los niveles hormonales de la hormona folículo estimulante (FSH) y la testosterona, así como el volumen testicular, los resultados histológicos y los resultados del laboratorio de embriología se obtuvieron de un examen sistemático del registro clínico en el Laboratorio CRECER y la Clínica y Maternidad Pueyrredón. Para la medición del volumen testicular, se utilizó el orquidómetro de Prader o el de Seager,<sup>15</sup> considerándose un valor normal entre los 15-18 ml.

La práctica se realizó bajo sedación y de forma ambulatoria, y el paciente fue dado de alta dentro de las 2 horas posteriores al procedimiento. Se realizó una pequeña incisión de 1 a 2 cm, permitiendo que todas las capas escrotales se corten en la túnica albugínea, que se incidió con un bisturí, exponiendo así el tejido testicular por simple compresión.<sup>16</sup> Las muestras se enviaron al laboratorio de embriología donde se sumergieron en medio HTF modificado (Irvine Scientific catálogo n° 90126) suplementado con 0,3 mg de albúmina sérica humana (HSA) para su análisis.<sup>3, 16</sup>

La muestra se examinó en condiciones estériles. Se colocó en una cápsula de 60 x 15 mm (Nunclon) y, con la ayuda de dos portaobjetos, se desagregó el tejido.<sup>17</sup> Con el fin de encontrar espermatozoides maduros, tanto móviles como inmóviles, el material suspendido se observó a través del microscopio invertido (Olympus IX71) con un aumento de 20X, a una temperatura de 37° C. Los espermatozoides se lavaron con 1 ml de HTFm suplementado con 0,3 mg/ml de HSA mediante centrifugación a 300 rpm durante 10 minutos. Después del lavado, el sedimento se recuperó en 0,5 ml del mismo medio.<sup>16</sup>

### Análisis estadístico

La capacidad predictiva y la precisión del diagnóstico de la hormona FSH, la testosterona y el

volumen testicular en relación con los espermatozoides obtenidos mediante TESE se determinaron sobre la base del análisis de características operativas del receptor (ROC). Esto permitió determinar el valor límite de corte para las variables a estudiar, así como determinar la especificidad, sensibilidad y su precisión diagnóstica.<sup>18</sup>

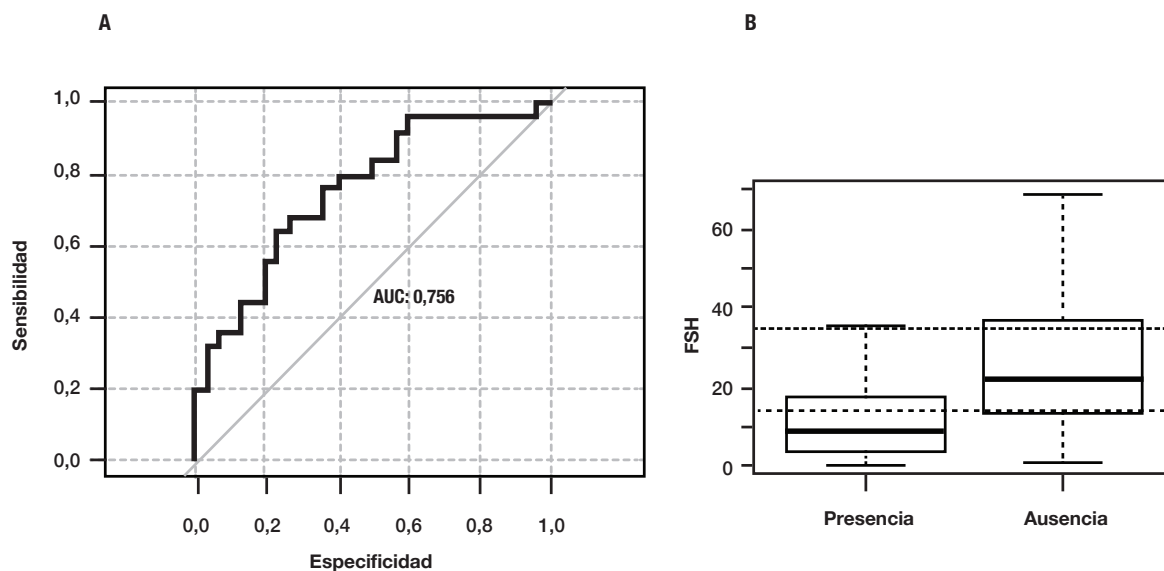
Además, se estableció un índice llamado "IFT", que relaciona los niveles de la hormona FSH y el volumen testicular ("IFT"-index FSH/ Testicular Vol.). De los 68 pacientes analizados en este trabajo, para este análisis se incluyeron solo 38 pacientes, ya que estos cumplían con el requisito de presentar simultáneamente los datos de FSH, volumen testicular y presencia/ausencia de espermatozoides. Los pacientes se dividieron en diferentes grupos basándose en lo que establece Escobar Carmona et al. (2009) y Velasco Ruiz et al. (2010), los cuales consideran un valor normal de FSH en hombres de 1,5-12,4 mUI/ml y un volumen testicular normal de 15-18 ml. Los pacientes se dividieron en tres grupos: Grupo 0 (volumen testicular 8-11 = ml y FSH  $\geq$  13 mUI/ml); grupo 1 (volumen testicular = 12-18 ml y FSH = 7-12 mUI/ml) y grupo 2 (volumen testicular = 19-20 ml y FSH = 0,09-6 mUI/ml). Con el fin de determinar un valor de índice IFT a través de TESE, se realizó un análisis ROC.

Para analizar la relación entre el hallazgo de espermatozoides determinado por el laboratorio de anatomopatología y los hallazgos del laboratorio de embriología, se realizó la prueba de Chi cuadrado, con un nivel de confianza de 95.

### Resultados

La capacidad de diagnóstico de la hormona FSH en relación con la recuperación de espermatozoides a través de TESE proporcionó un valor bajo la curva (AUC) de 0,756 (IC 95%: 0,6268-0,8852) (Figura 1a). El valor umbral permite discriminar entre el éxito y el fracaso en la obtención de espermatozoides con una determinada sensibilidad y especificidad. En este trabajo el valor umbral que arrojó el análisis de ROC para la hormona FSH fue de 15,85 mUI/ml (Tabla 1). En cambio, el valor a partir del cual todos los casos fueron negativos en la obtención de espermatozoides en el TESE fue mayor o igual a 35,7mUI/ml (Figura 1b).

**Figura 1.** Valor predictivo de FSH frente al hallazgo de espermatozoides en TESE. **A)** Análisis ROC. Se puede ver el área debajo de la curva (AUC). **B)** Boxplot corresponde a los valores hormonales de FSH de pacientes con presencia o ausencia de espermatozoides en el TESE. La línea discontinua corresponde al valor umbral de 15,85 arrojado por el análisis ROC y la línea de puntos corresponde al valor de FSH de 35,7 mUI/ml.



Con respecto a la recuperación de espermatozoides mediante TESE en relación con la hormona testosterona, el AUC mostró un valor de 0,606 (Figura 2) (IC del 95%: 0,443-0,769) (Tabla 1). En cuanto a la recuperación de los espermatozoides mediante TESE en relación con el volumen testicular, el área bajo la curva mostró un valor de 0,743 (Figura 3) (IC del 95%: 0,6254-0,8611). El valor umbral que se muestra en la curva fue de 15,50 mUI/ml (Tabla 1). El valor que permite la discriminación entre el éxito y el fracaso en la obtención de espermatozoides a través de TESE fue de 18 ml (Figura 3b).

En vista de los resultados obtenidos para los valores de FSH (mUI/ml) y volumen testicular (ml), se estableció un índice que relaciona ambos parámetros, el cual se denominó IFT.

El análisis ROC para el índice IFT en relación con la recuperación de espermatozoides a través de TESE mostró un valor de AUC de 0,723 (Figura 4a). El valor umbral fue 2,5 (Figura 4b) (Tabla 1).

Finalmente, para evaluar si existe alguna correlación entre el hallazgo de espermatozoides en la muestra de TESE al comparar los laboratorios de

anatomía patológica y el de embriología, se analizó la presencia/ausencia de estos sobre las mismas biopsias testiculares realizando el análisis biológico e histológico de manera simultánea.

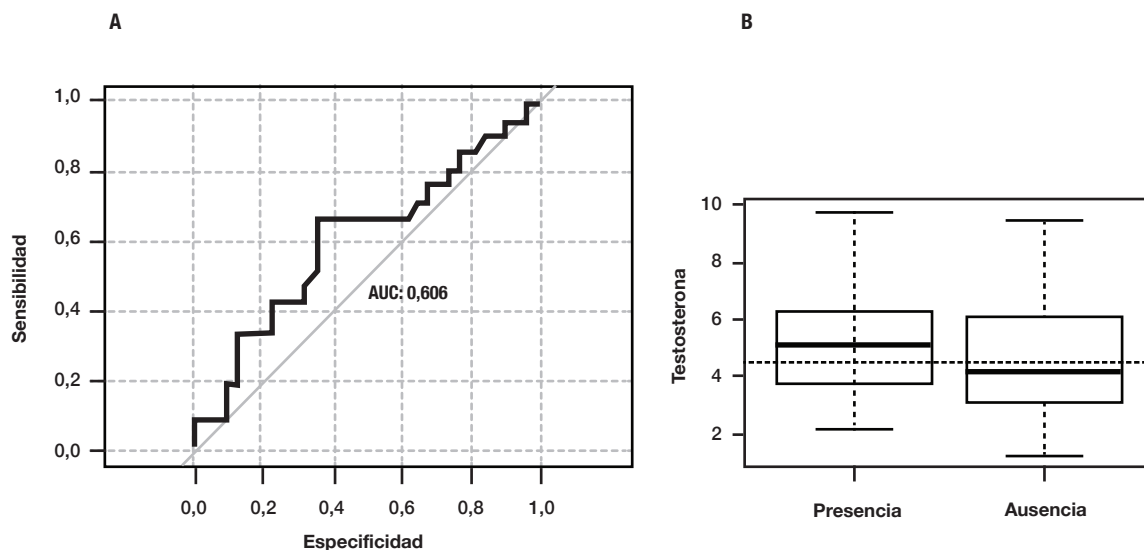
En cuanto a la detección de presencia de espermatozoides en la muestra de TESE, se encontraron diferencias significativas entre ambos laboratorios en favor del laboratorio de embriología ( $X^2 = 3,94$ ,  $p = 0,0469$ ), así como también se hallaron diferencias significativas para la ausencia de espermatozoides al comparar ambos laboratorios ( $X^2 = 13,23$ ;  $p = 0,0002$ ).

## Discusión

La FSH sérica es un reflejo indirecto de la función y la histología general de los testículos como un todo. Por lo tanto, la FSH puede predecir la presencia de espermatozoides en biopsias usando técnicas convencionales como TESE.<sup>21,22</sup> Esta hormona se ha utilizado como un indicador de la espermatogénesis, pero el criterio óptimo para el nivel sérico aún no se ha determinado con precisión.<sup>23</sup>

En nuestro trabajo, de los 68 pacientes estudiados, solo se incluyeron 44 pacientes para este

**Figura 2.** Valor predictivo de la hormona testosterona frente al hallazgo de espermatozoides en TESE. **A)** Análisis ROC. Se puede ver el área debajo de la curva (AUC). **B)** Boxplot corresponde a los valores hormonales de testosterona en pacientes con presencia o ausencia de espermatozoides en el TESE. La línea discontinua corresponde al valor umbral de 4,5 arrojado por el análisis ROC.



**Tabla 1.** Exactitud diagnóstica de FSH sérica, testosterona, volumen testicular e índice IFT sobre el resultado de TESE.

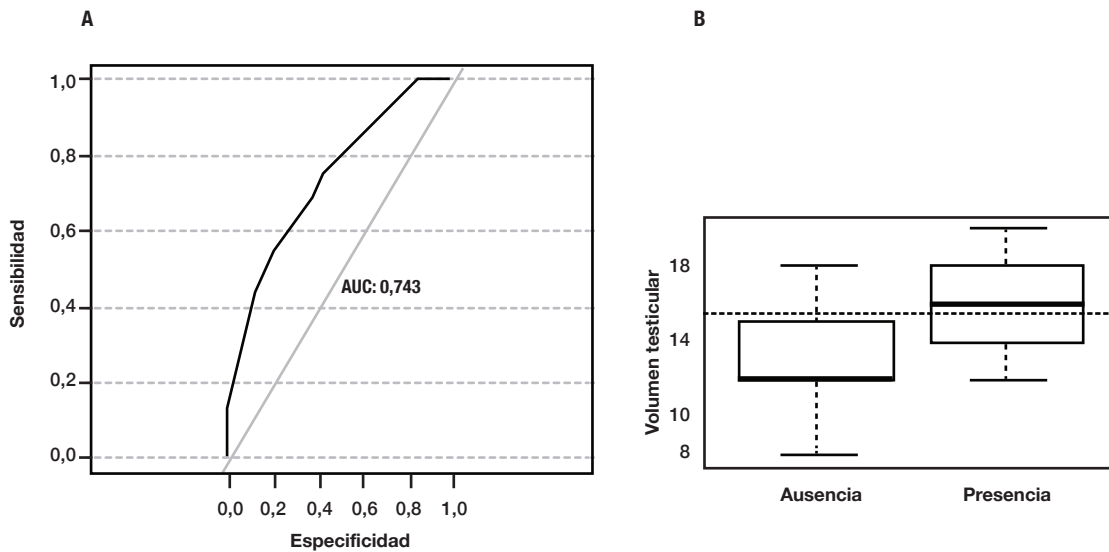
VARIABLES	AUC 95% CI	Value of cut	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy of the diagnosis	Predictive value Positive (%)	Predictive value Negative (%)
FSH	0.756	15.85	0.6800000	0.7333333	0.7090909	0.6800000	0.7333333
VOLUMEN TESTICULAR	0.694	15.50	0.8400000	0.5000000	0.6440678	0.5526316	0.8095238
TESTOSTERONA	0.606	4.50	0.6666667	0.6451613	0.6538462	0.5600000	0.7407407
índice IFT	0.7232	2.5	0.3478261	1.0000000	0.6052632	1.0000000	0.5000000

análisis, debido a que solo estos pacientes tenían los valores de FSH en sus historias clínicas. El análisis ROC mostró un valor de corte de 15,85 mUI/ml, pero este valor no pudo predecir el éxito o el fracaso de la recuperación de espermatozoides. Sin embargo, observamos que los pacientes en los cuales el valor de FSH fue superior a 35,7 mUI/ml obtuvimos casos negativos en la obtención de espermatozoides en el TESE (Figura 5b), mientras que los pacientes con valores de FSH inferiores a 35,7 mUI/ml no permitirían presumir la presencia o ausencia de espermatozoides. Por este motivo se estableció que valores de este pa-

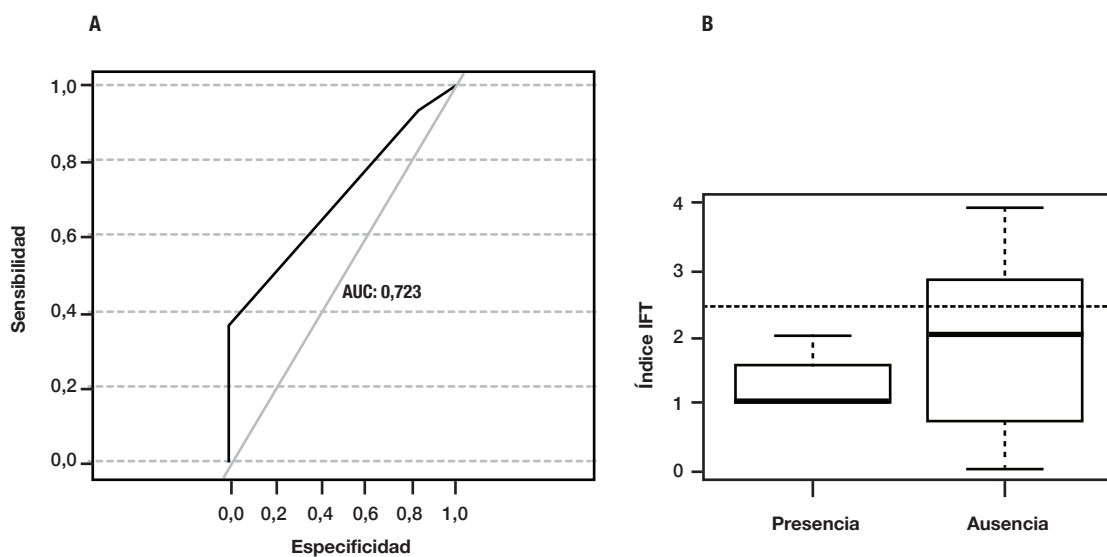
rámetro por encima de 35,7 mUI/ml permitirían predecir una falla en la recuperación espermática en el TESE.

Estos resultados no concuerdan con lo establecido por Shyh-Chyan et al.<sup>24</sup>, quienes establecen que valores para FSH mayores a 19,4 mUI/ml permiten asegurar la falla en la recuperación espermática. Esta diferencia entre los valores para el fracaso en obtención de espermatozoides puede deberse a la cantidad de muestras con las que se realizó este análisis. En este estudio, se analizaron los valores hormonales de FSH de 44 pacientes, mientras que en el estudio de Shyh-Chyan et al.<sup>24</sup> fueron analizados 206 pacientes. Otra causa pue-

**Figura 3.** Valor predictivo del volumen testicular versus el hallazgo de espermatozoides en TESE. **A)** Análisis ROC. Se puede ver el área debajo de la curva (AUC). **B)** Boxplot corresponde a los valores del volumen testicular de los pacientes con presencia o ausencia de espermatozoides en el TESE. La línea discontinua corresponde al valor umbral de 15,50 ml arrojado por el análisis ROC.

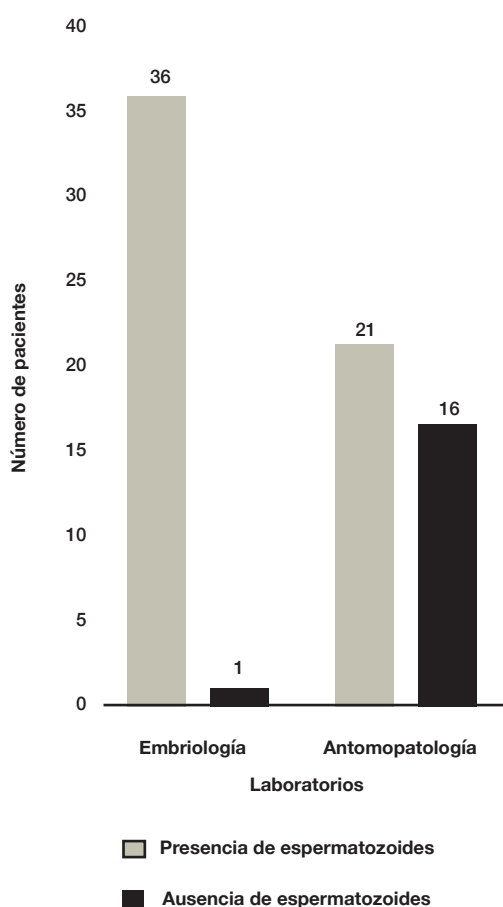


**Figura 4.** Valor predictivo del índice IFT contra el hallazgo espermático en TESE. **A)** Análisis ROC. Se puede ver el área debajo de la curva que arrojó un valor de 0,723. **B)** Boxplot corresponde a los valores del índice IFT vs. el hallazgo de espermatozoides en el TESE. La línea discontinua corresponde al valor umbral de 2,5 lanzado en el análisis ROC.





**Figura 5.** Hallazgos de espermatozoides del laboratorio de embriología vs. el laboratorio de anatomopatología. Proporción de pacientes en los que se encontraron espermatozoides (barras negras) y en los que no se encontraron formas maduras (barras grises). El asterisco indica diferencias significativas ( $X^2$ ,  $p < 0,05$ ).



de ser la metodología de recuperación empleada, ya que en nuestro trabajo se disgregó la biopsia y se procedió a la búsqueda de espermatozoides, mientras que en el trabajo de Shyh-Chyan et al.<sup>24</sup> las muestras obtenidas se fijaron en Bouin y se observaron los cortes de las mismas.

El 80% del volumen testicular consiste en los túbulos seminíferos, por lo que también se considera un factor pronóstico para la infertilidad.<sup>25</sup> En este estudio, el valor predictivo del volumen testicular fue  $\geq 18$  ml.

El índice de IFT que relaciona la hormona FSH con el volumen testicular permitió establecer que los hombres con  $IFT \geq 2,5$  tienen un pronóstico favorable en la recuperación de espermatozoides a través de TESE. La identificación de índices de pronóstico – basados en estudios poblacionales observacionales – se estableció mediante el estudio de una serie de escalas destinadas a organizar toda la información de un paciente según los niveles de predictividad. La capacidad predictiva de este índice es relevante porque una característica física y una prueba de sangre pueden ayudar al médico a predecir la presencia de espermatozoides en una biopsia testicular antes de someter al paciente a una operación quirúrgica que implica una gran carga psicológica, económica y física.

Mendel et al.<sup>13</sup> establecieron que existe una relación entre los exámenes histológicos y embriológicos. El presente estudio no concuerda con los hallazgos de Mendel ya que no hemos encontrado correlación entre los hallazgos del análisis histológico testicular y los resultados del laboratorio de embriología al medir las posibilidades de detección de espermatozoides en tejido testicular obtenido mediante TESE en pacientes azoospermicos. Por esta razón, consideramos que la histología testicular no desempeñaría un papel vital en el pronóstico de fertilidad de los pacientes azoospermicos, opuesto a Raheem et al.<sup>26</sup> y otros que es probable que recuperen los espermatozoides en la anatomía patológica.

## Conclusión

Sobre la base de este trabajo, es posible concluir que la hormona FSH, el volumen testicular y el índice IFT son parámetros relevantes a considerar cuando se trata a un paciente azoospermico.

Finalmente, no existe correlación entre los hallazgos del laboratorio de anatomopatología y los del laboratorio de embriología, siendo este último mucho más eficiente para detectar espermatozoides en la muestra obtenida a través de TESE.

## Referencias

1. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 2: 271-285.
2. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic SciInt* 1982; 20: 9-10.

3. Cissen AM, Meijerink KW, D'Hauwers A et al. Prediction model for obtaining spermatozoa with testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2016; 31: 1934-1941.
4. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod* 2007; 13: 539-549.
5. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl* 2012; 14: 82-87.
6. Cisneros-Madrid JB, Navarro-Martínez C, Castro-Gaytán AE et al. Micro-disección testicular para la obtención de espermatozoides (m-TESE): nueva modalidad terapéutica en pacientes con azoospermia no obstructiva y niveles elevados de hormona folículo estimulante. *Rev Mex Urol* 2014; 6: 375-378.
7. Devroey P, Liu J, Nagy Z et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10: 1457-1460.
8. Vloeberghs V, Verheyen G, Haentjens P et al. How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2015; 0: 1-7.
9. Sidney G, Vieiral M. Prognostic factors for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *CLINICS* 2013; 68: 121-124.
10. Silber SJ, Nagy Z, Liu J. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 2031-2043.
11. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995; 10: 148-152.
12. Bettella A, Ferlin A, Menegazzo M et al. Testicular fine needle aspiration as a diagnostic tool in non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2005; 3: 289-294.
13. Mendel P, Oses R, Bisioli C et al. Comparison between laboratory findings and histological diagnosis in TESE from men with non-obstructive azoospermia. *Proceedings of the 8th International Congress of Andrology. MonduzziEDs. Bologna, 2005.*
14. Vinay JI, Valdevenito R, Palma C et al. Azoospermia y fertilización asistida: rol de la histología testicular en el éxito de ICSI. *Rev. chilena de urol* 2013; 78.
15. Teppa A, Palacios A. Evaluación actual de infertilidad masculina. *Rev Invest Clin.* 2004; 45: 355-370.
16. Frattini G, Andreatta E, Elena AC, Distilo C, Landi G, Vitolo Gomez M et al. Fertilización, calidad embrionaria, embarazos clínicos e implantación luego de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides obtenidos de biopsia testicular. *Rev Arg Urol* 2013; 78: 96-102.
17. Ezech UIO, Moore HDM, Cooke IDA. Prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive. *Hum Reprod* 1998; 13: 3075-3080.
18. Altman DG, Bland JM. Diagnostic test 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994; 309: 188-190.
19. Escobar Carmona E, Pérez Valdés N, Triburcio Carbone Meneses J et al. Reference values in adults. *GME* 2009; 11: 608-8921.
20. Velasco Ruiz M, Parra Gordo ML, Pena Fernández I et al. Evaluación ecográfica de la patología testicular más frecuente. *Euro Eco* 2010; 3: 49-54.
21. Chen CS, Chu SH, Lai YM, Wang et al. Reconsideration of testicular biopsy and follicle-stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod* 1996; 11: 2176-2179.
22. Kahraman S, Ozgur S, Alatas C et al. High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1996; 11: 673-676.
23. Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels a study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4059-4063.
24. Shyh-Chyan C, Ju-Ton H, Hong-Jeng Y et al. Appropriate cut-off value for follicle-stimulating hormone in azoospermia to predict spermatogenesis. *RB&E* 2010; 8: 108-203.
25. Barret K. *Fisiología Médica.* 22 ed. Ganong. Fisiología Médica, España: McGraw Hill 2010.
26. Raheem AA, Garaffa G, Rushwan N et al. Testicular histopathology as a predictor of positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU International* 2012; 111: 492-499.