

## Controversias sobre Microinyección de espermátidas en humanos

### *Controversies on human spermatid injection*

Peinado I, Ten J, Mendiola J, Cuevas I, Bernabeu R

Instituto Bernabeu, Fertilidad y Ginecología

#### **Resumen**

*En los últimos años, se ha desarrollado la técnica de la microinyección intracitoplásmica de espermátidas pero las tasas de gestación siguen presentándose bajas. En el presente trabajo de revisión se describe la evolución de la técnica. Detallándose la experimentación llevada a cabo y éxitos conseguidos en animales y humanos. Además, se apuntan contraindicaciones, dificultades y obstáculos con los que hoy en día nos seguimos encontrando. Actualmente se hace énfasis en la selección de pacientes y en el desarrollo de nuevas técnicas que conduzcan a una correcta identificación de espermátidas viables, todo ello con el fin de proporcionar una mayor tasa de gestación.*

**Palabras clave:** Spermatid. Microinyección de espermátidas redondas. Microinyección de espermátidas elongadas. ROSI. ELSI.

#### **Summary**

*In the last years, the intracytoplasmic spermatid injection has been developed as the method of choice in the treatment of several factors of infertility as well as in azoospermia patients, but it was associated with a significantly lower pregnancy rate. This work reviews the evolution of the technique, it details the experimentation and successful results animals and human. Furthermore, this work records difficulties and obstacles we continue facing nowadays. This days a new prognosis based on the Y-chromosome molecular screening and the PRM-mRNA ratio is offered to the selection of patients and a technology to identification a right spermatid has been developed.*

**Key words:** Spermatid. Round spermatid injection. Elongated spermatid injection. ROSI. ELSI.

---

Recibido: 9-01-02

Aceptado: 30-01-02

**Correspondencia:** Dra. Irene Peinado Casas

Avd/ de la Albufereta, 31

03016 Alicante

España

## INTRODUCCIÓN

El primer éxito de fecundación in vitro en mamíferos tras microinyección espermática se consiguió en hámster en 1976 por Echara y Yanagimachi. La tasa de fecundación fue muy baja hasta que en 1992 Palermo y col., consiguieron mejorar la técnica de micromanipulación, con el desarrollo de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Debido a la elevada tasa de fecundación obtenida tras la aplicación de esta técnica, la práctica de la microinyección subzonal de espermatozoides, o SUZI, fue abandonada casi en su totalidad. Desde entonces, la ICSI se ha utilizado en todo el mundo como un tratamiento para:

- \* Casos en los que la FIV convencional no ofrece muchas garantías de éxito.
- \* Hombres con alteraciones seminales (oligo, terato, astenozoospermia o combinaciones de ellas).
- \* Azoospermias obstructivas/secretoras obteniendo los espermatozoides del epidídimo (MESA) o del testículo (PAAF/ TESA).
- \* Enfermedades masculinas cuyo tratamiento puede producir pérdida o disminución de la fertilidad (p. ej: radioterapia, quimioterapia para cáncer) utilizando espermatozoides que se criopreservan previamente a la realización de dichos tratamientos.
- \* En pacientes con riesgo de transmisión a la descendencia de enfermedades infecciosas (VIH), mediante el empleo de espermatozoides criopreservados, tras el despistaje de los virus por técnicas de PCR.
- \* En pacientes portadores de enfermedades genéticas (Distrofia muscular de Duchenne (DMD), Fibrosis quística (FQ), Hemofilia,...) que se derivan hacia la práctica de un diagnóstico genético preimplantatorio (DGP).

La resolución de todos estos casos nos ha demostrado que son innecesarios muchos pasos fisiológicos requeridos para la fecundación normal, en la que los espermatozoides sufren una maduración funcional a través del tránsito genital:

**1. Masculino** (epidídimo, vasos deferentes y secreciones de las glándulas accesorias), proporcionándole al espermatozoide:

- \* movilidad progresiva óptima.
- \* reestructuración del acrosoma y de las membranas para facilitar la fecundación.
- \* condensación y protección del material genético.

**2. Femenino** (vagina, cérvix, útero y trompas de Falopio), adquiriendo los espermatozoides la capaci-

dad de llevar a cabo la reacción acrosómica (RA) en presencia del estímulo adecuado.

Estas etapas, por tanto, quedan anuladas cuando el gameto masculino es microinyectado en el interior del ovocito, y parece que no son indispensables para el posterior desarrollo del embrión. Por tanto, sería razonable admitir la hipótesis de que *la maduración del espermatozoide en los tractos masculino y femenino sólo es necesaria para que el espermatozoide pueda alcanzar al ovocito y penetrarlo in vivo*.

Previa a la maduración espermática citada, se produce la espermiogénesis: período en el cual las espermátidas redondas, haploides (1/2 del material genético de su especie), se diferencian en espermatozoides a través de grandes transformaciones morfológicas. Es una fase larga, que dura 23 días en humanos. Muchos de estos cambios tienen lugar durante o después de la condensación del DNA y el final de la transcripción. Es interesante puntualizar que durante la espermiogénesis (fase posmeiótica), el RNA sintetizado es la reproducción de la totalidad del material hereditario, a pesar de que las espermátidas sean haploides. Esto ocurre gracias al sincitio que mantiene unidas a las espermátidas citoplasmáticamente, durante toda la espermatogénesis, compartiendo de esta forma, los RNAm.

¿Son necesarias in vitro las modificaciones que ocurren en este proceso?. Es decir, ¿Los cambios que sufre la célula masculina durante la espermiogénesis son imprescindibles para el desarrollo normal del embrión y del individuo?

En principio, la microinyección de espermátidas en el interior del ovocito, no debería suponer ningún problema en cuanto a su falta de movilidad o no adquisición de las proteínas de reconocimiento de membrana, como ya hemos visto en los espermatozoides, pero sí en cuanto a su capacidad de poder asegurar la fecundación de forma idónea. Cabe recordar, que el desarrollo y utilización de la ICSI en humanos también creó controversia, de la misma forma que lo hace ahora la microinyección intracitoplasmática de espermátidas redondas (ROSI) o la microinyección intracitoplasmática de espermátidas elongadas (ELSI).

Los inconvenientes que presentaría la microinyección de espermátidas, serían los siguientes:

### 1. Incompleta maduración de las proteínas nucleares,

Como ya indicaron varios autores (1-3), la mayor dificultad puede asociarse con la incompleta maduración de las proteínas nucleares. En la espermiogénesis se condensa el núcleo, de forma que las proteínas

que acompañan al DNA, las histonas, son substituidas en un 90% por otras más básicas, las protaminas, que permiten una mayor protección, reforzándose posteriormente por la adquisición de puentes disulfuro. Todo ello implica un aumento de la compactación nuclear. Tras la fecundación, se eliminan los puentes disulfuro y las protaminas son remplazadas de nuevo por histonas, pero esta vez de origen ovocitario.

Así pues, esta falta de compactación del DNA masculino podría explicar el hecho de que la descondensación del núcleo de las espermátidas redondas se realice en menos tiempo que el de los espermatozoides. De hecho, se observa una disminución en el tiempo de desarrollo de los pronúcleos, formándose ambos antes de 10-12 horas versus 16-18, que precisan los espermatozoides (4) y (5). La menor condensación de las espermátidas humanas, también queda demostrada, porque existe una menor cantidad de las dos protaminas-ARNm cuanto más dañada está la espermatogénesis (6).

Según algunos autores, este proceso de condensación nuclear parece ser importante sólo para alcanzar al ovocito y poder transmitir su DNA inalterado. Sin embargo, no faltan estudios en los que se apunta el alto porcentaje de cromatina anormalmente condensada en espermátidas elongadas procedentes de pacientes con fallo de maduración incompleta, frente a espermátidas procedentes de pacientes que presentan una histología normal (7). Además, debemos considerar que todavía no conocemos si pueden existir dificultades en la unión del pronúcleo masculino y la división embrionaria asociada con la presencia de histonas masculinas de origen desconocido, cuando las espermátidas tempranas que no han llevado a cabo la transición histona-protamina son microinyectadas en los ovocitos (5).

## 2. Activación del ovocito.

De forma natural la penetración del espermatozoide deviene el estímulo que dispara la activación del ovocito a través de cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$ . Estos cambios son inducidos por receptores del ovocito, que disparan todos estos eventos a través de la proteína G heterotrimérica que, activaría a la fosfolipasa C y a la PKC (proteínquinasa C). Las consecuencias del incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  son:

- \* La liberación de los gránulos corticales, denominada Reacción Cortical, que actuaría como mecanismo de bloqueo de la polispermia.
- \* El reinicio de la meiosis femenina (metafase II a anafase II), por la degradación de la ciclina B2

que inactiva el factor promotor de la maduración (MPF). El siguiente proceso en la activación del cigoto es la formación de los pronúcleos masculino y femenino.

Por tanto, el problema estaría resuelto si los ovocitos fueran activados antes o después de la microinyección con el fin de variar la concentración de  $Ca^{2+}$  que nos llevaría a una eliminación del MPF (1-3, 8-10). La activación del ovocito puede ser promovida artificialmente, de la misma forma que con el ICSI y otras técnicas de micromanipulación, por varios tratamientos tales como:

- \* Aspiración vigorosa del ooplasma durante la microinyección, (2-3, 8-10)
- \* Aplicación de pulsos eléctricos, (11)
- \* Incubación corta con ionóforo de calcio, (9, 12, 13)
- \* Microinyección de oscilina, (14)

## 3. Centrosoma

Muchos de los conocimientos de la biología del centrosoma fueron descubiertos por Boveri en 1901, quién observó que un ovocito maduro posee todos los elementos necesarios para la fecundación, excepto aquellos precisos para una división activa, que son introducidos por el espermatozoide.

El centrosoma es una compleja organela compuesta por muchas proteínas diferentes. La caracterización molecular del centrosoma está todavía en sus principios, quizá una de las más importantes proteínas del centrosoma es la  $\gamma$ -tubulina, importante en la nucleación de los microtúbulos y en definir su polaridad.

La evidencia de que el centrosoma es de herencia paterna en humanos procede de los estudios de polispermia. Durante la polispermia, los ovocitos humanos desarrollan múltiples husos espermáticos, cada uno de ellos asociado con un espermatozoide. Durante la partenogénesis, donde no hay contribución de centrosoma paterno, no se forma huso espermático.

El espermatozoide no contiene cantidad apreciable de  $\gamma$ -tubulina aunque, poco después de la penetración del espermatozoide, la  $\gamma$ -tubulina materna es atraída al centrosoma del espermatozoide para asistir a la formación, y subsiguiente elongación, del áster espermático. La transformación final del centrosoma masculino es una estructura combinada de ambos constituyentes paterno y materno. (15) Defectos en la nucleación de los microtúbulos pueden conducir a la ausencia de fecundación en ovocitos humanos. En los espermatozoides humanos maduros, la centrina, proteína de 20 kDa, sensible al calcio, es detectada en uno o dos focos en la base de la cabeza del esperma-

tozoide, posiblemente correspondiendo a los centríolos, y puede estar implicada en separar la cola. Este proceso está facilitado probablemente por cambios en el estado de fosforilación de las proteínas que conectan la pieza intermedia y centríolo, y la unión de iones de calcio liberados durante la activación del ovocito a las proteínas centrosomales tales como la centrina.

Hoy en día desconocemos si en las células germinales muy inmaduras, tales como espermátidas redondas, el centrosoma es funcional, o si el ovocito cuenta ya con las fuentes centrosomales maternas para la movilidad necesaria y obtención de fecundación.

#### 4. Asincronía del ciclo celular,

El ciclo celular del ovocito no coincide con el de las espermátidas ni con el de los espermatozoides maduros, pero el núcleo de los espermatozoides escapa a la condensación prematura de los cromosomas debido a su configuración especial de la cromatina mantenida por su asociación DNA-protamina. Es especialmente esta ausencia de disposición de la cromatina la que distingue el uso de ROSI-ELSI vs ICSI, más que el ciclo celular per se (8-10). Por tanto, y como ya citamos en el primer punto, el pronúcleo masculino se observa antes que el femenino si microinyectamos con espermátidas, lo que podría influir en su posterior desarrollo (5).

#### 5. Mitocondrias masculinas

Mientras se asume una estricta herencia materna, la realidad es confusa y parece ser que hay una baja pero continua tasa de transmisión de DNA mitocondrial paterno. Hay al menos cuatro posibilidades para explicar esta dominancia materna:

- \* Las mitocondrias espermáticas pueden persistir pero desaparecen después de su reconocimiento (el ovocito tiene alrededor de 100.000 copias de DNA mitocondrial mientras que el espermatozoide sólo tiene 75-100)
- \* Las mitocondrias del espermatozoide sobreviven pero son incapaces de replicarse (los núcleos de espermátidas redondas son deficientes en la transcripción del factor A)
- \* Las mitocondrias espermáticas son degradadas por su actividad, y mueren o desaparecen después de la fecundación
- \* Las mitocondrias espermáticas son destruidas por señales específicas que las identifican como paternas. Hallazgos ultraestructurales muestran que las mitocondrias de la misma especie son

eliminadas debido a señales originadas posiblemente por proteínas de la pieza intermedia. La ausencia en el núcleo de la espermátida redonda del factor de transcripción A podría ser la explicación.

Las técnicas de reproducción asistida tales como el ICSI pueden transmitir enfermedades mitocondriales de hombres infértiles, al saltar la barrera natural selectiva contra los espermatozoides anormales. Particularmente, *este fenómeno podría ser más probable que ocurriera al utilizar células germinales muy inmaduras*, donde el número de mitocondrias transmitidas es mayor y las señales de las proteínas de la pieza intermedia para ser destruidas por el cigoto puede que no se hayan formado.

#### 6. “Imprinting” genómico.

En células diploides la inactivación de alguno de los alelos paterno o materno se denomina imprinting, y se consigue posiblemente a través de modificaciones en su DNA por metilación 5' en residuos de Citosina (16). Esta modificación es reversible mediante el proceso inverso (desmetilación) que se produce cuando los genes “silenciosos” han de ser reactivados. El imprinting genómico es crítico para el normal desarrollo, y su disrupción durante la gametogénesis o en las etapas tempranas del desarrollo puede llevar a desajustes genéticos importantes, llegando a desarrollar tumores malignos. El papel exacto del imprinting en la gametogénesis humana está todavía por aclarar, ya que existe un alto número de especulaciones basadas en evidencias indirectas (17, 18). La combinación de la ICSI con células germinales inmaduras puede ayudar a aclarar el estado en el que se completa el imprinting.

Un estudio piloto no revela diferencias en la expresión de genes “imprimados” femeninos o masculinos en embriones de ratón procedentes de ROSI. Además, el encontrar sólo huella de actividad metiltransferasa residual en espermátidas redondas ha provocado la hipótesis de que el imprinting es completo una vez concluida la meiosis (5) y (19). Los nacidos vivos sanos tanto en ratón como ahora en humanos, apoyan la hipótesis de que el imprinting genómico de las células de la espermatogénesis está completa en el estadio de espermatozoides secundario en el ratón y por tanto en el estado de espermátida redonda en humanos (20)

Así pues, teniendo en cuenta la biología de la espermiogénesis sería de vital importancia la elección de espermátidas que tuvieran la máxima capacidad fecundante.

## EXPERIENCIA CLÍNICA EN ROSI Y ELSI

Tras la experimentación en animales (Tabla 1). Edwards y col., 1994, sugirieron su aplicación en humanos. De esta forma los varones con azoospermia no obstructiva podrían ser tratados mediante ROSI o ELSI (Tabla 2).

Desde el primer nacimiento con ELSI en 1995,

muchos grupos han introducido esta técnica para el tratamiento de varones en los que no se localizan espermatozoides. Sin embargo, los resultados no son del todo satisfactorios. En todos estos años de ensayos podemos rescatar las siguientes conclusiones:

1º.- Durante la técnica de la microinyección, es preferible introducir la espermátida completa en lugar de su núcleo aislado por tres razones principales:

**Tabla 1**

*Experimentación en animales. Spd (espermátida); E (embriones); B (blastocistos).*

Animal	Técnica	Nº E/B	Nº Nacidos	Referencia
Ratón	Electrofusión	346E	4	Ogura y col., 1994
Conejo	ICSI con núcleo spd.	121E	3	Sofikitis y col., 1994
Conejo	ICSI con núcleo spd.	150E	14	Sofikitis y col., 1996
Cerdo	Estim. Eléc. e ICSI con núcleo spd.	87B	?	Kim y col., 1999
Cerdo	Estim. Eléc. e ICSI con spd.	99B	?	Kim y col., 1999
Ratón	ICSI con spd. Elongada	44B	5	Yazawa y col., 2001

**Tabla 2**

*ICSI con espermátidas en humanos*

Técnica	Origen	Embarazos	Nacidos	Referencia
ELSI	Testículo	0	0	Vanderzwalmen y col., 1995
ELSI	Testículo	1	1	Fishel y col., 1995
ROSI	Eyaculado	2	2	Tesarik y col., 1996
ELSI	Eyaculado	0	0	Tesarik y col., 1996
ROSI	Testículo	0	0	Chen y col., 1996
ROSI	Testículo	2	0	Antinori y col., 1997
ELSI	Testículo	3	0	Antinori y col., 1997
ROSI	Testículo	2	1	Vanderzwalmen y col., 1997
ELSI	Testículo	1	1	Vanderzwalmen y col., 1997
ELSI	Test. Y Eyac.	4	0	Amer y col., 1997
ELSI	Testículo	3	3	Araki y col., 1997
Espermatozocito	Testículo	1	1	Sofikitis y col., 1998
ELSI	Testículo	1	1	Bernabeu y col., 1998
ROSI	Testículo	0	0	Imad y col., 1999
ROSI	Testículo crio	0	0	Al-Hasani y col., 1999
ELSI	Testículo	4	3	Zech y col., 2000
ROSI	Testículo	0	0	Leuran y col., 2000
ROSI	Testículo	0	0	Vicdan y col., 2001

\* Se supone que el factor activador del ovocito se encuentra en el citoplasma de la célula espermática, por lo que su eliminación podría provocar una anormal activación ovocitaria.

\* El aislamiento del núcleo de la espermátida podría dañar a los centrosomas de la célula. En humanos, así como en otras especies animales (con excepción del ratón y otros roedores) los centrosomas de origen paterno se necesitan para la nucleación normal de los microtúbulos del cigoto, para la formación de un áster implicado en la colocación pronuclear y en la organización de los husos acromáticos mitóticos del nuevo embrión.

\* El procedimiento de aislamiento del núcleo podría dañar la membrana nuclear facilitando la pérdida parcial del material intranuclear.

Aunque tal vez existan diferencias entre especies (11), alguno de estos tres factores descritos podrían ser la causa de los abortos espontáneos producidos tras la microinyección de núcleos aislados de espermátidas redondas, en el interior del citoplasma ovocitario.

**2°.-** Las espermátidas elongadas son las más idóneas para este proceso, de forma que se efectúa preferentemente ELSI vs ROSI.

**3°.-** Estas técnicas se asocian a una disminución de las tasas de fecundación y desarrollo embrionario, dando lugar a embriones de baja calidad y descenso del porcentaje de embarazo.

**4°.-** Se apunta un mayor potencial de malformaciones derivadas de estas técnicas.

Uno de los problemas esenciales de la técnica sería la identificación de una espermátida viva, y esto no es un proceso fácil (3) y (24), comprobaron que cabezas de espermatozoides anormales habían sido confundidas con espermátidas. Sin ninguna técnica de tinción, resulta difícil su clasificación. En 1969 Krester y Kerr, dividieron las espermátidas en cuatro categorías de acuerdo a su forma, cantidad de citoplasma y tamaño del flagelo, y las clasificaron en: Spd redonda, Spd elongándose, Spd elongada y Spd madura. Esta clasificación fue modificada por Sousa y col. (1999), con el fin de identificar las células según las características de trabajo de que dispone un laboratorio de FIV.

\* (Sa1) Spd redondas de primer orden se pueden distinguir las células de Sertoli por el núcleo de estas últimas, siendo ambas de tamaño similar al de los eritrocitos,

\* (Sa2) son aquellas en las que emerge el pequeño flagelo.

\* (Sb1) mantienen su cuerpo citoplasmático redondo y alargan el flagelo,

\* (Sb2) como la anterior, pero con el núcleo oval localizado en la periferia de la célula,

\* (Sc1) Spd que está caracterizada por un cuerpo celular elongado y el comienzo de la protrusión nuclear,

\* (Sc2) la protrusión está más avanzada,

\* (Sd1) progresa la protrusión del núcleo,

\* (Sd2) ya ha concluido la protrusión de forma que el núcleo está fuera del elongado cuerpo celular.

Como ya hemos comentado, el aislamiento e identificación por criterios morfológicos no siempre revela su viabilidad. Por tanto, sin teñir o destruir la célula es imposible distinguir con absoluta certeza las células vivas de las muertas. La ausencia de métodos para identificar las espermátidas viables puede explicar la baja capacidad reproductiva. Sin embargo, es posible que las espermátidas recogidas de pacientes con bloqueo severo en la espermatogénesis sean totalmente idénticas a las obtenidas de varones con un bloqueo parcial o con un foco de espermatogénesis conservada. Se sugiere que la ausencia de espermatogénesis en todos los túbulos seminíferos afecta negativamente a la calidad de la espermátida y podría tener un origen genético (36).

## INDICACIONES DE ROSI Y ELSI.

En el estado actual en el que nos encontramos, el pronóstico de ELSI ó ROSI es más favorable para los hombres azoospermicos que tienen probada su capacidad de producir espermatozoides previamente.

En pacientes con un bloqueo completo de la espermiogénesis, la tasa de éxito es baja. La falta de factores necesarios para la activación del ovocito en las espermátidas de estos pacientes podría ser responsable, al menos en parte, de los pobres resultados obtenidos con ROSI (37). Esta observación está en oposición con el hecho de que espermátidas de varones con bloqueo parcial de la espermiogénesis puedan inducir señales de calcio similares a las inducidas por los espermatozoides maduros cuando se microinyectan en ovocitos (38). Muchos pacientes con fallo completo en la espermiogénesis también tienen habitualmente una alta incidencia de espermátidas con daños en el DNA atribuible a la apoptosis (37). El daño del DNA y la destrucción de factores de activación del ovocito, podrían estar relacionados con la apoptosis acelerada de las células germinales.

El futuro clínico de ELSI ó ROSI dependerá:

1.- Del desarrollo de nuevas técnicas que conduzcan a una correcta identificación de espermátidas viables.

2.- Mejora de los medios de cultivo in vitro de las células germinales, que permitiría la adquisición de células más maduras, con lo que obtendríamos embriones de mayor calidad (39-41). Los decepcionantes resultados clínicos de esta técnica podrían ser mejorados con la maduración in vitro. Este método sigue mostrando una baja fecundación pero mejora la tasa de formación de blastocistos (60%). Sería la mejor forma de seleccionar las espermátidas con mayor capacidad fecundante y obtener embriones evolutivos.

3.- Mejorar el conocimiento de los numerosos factores asociados con la inmadurez nuclear y citoplasmática de las células germinales masculinas.

4.- Desarrollo de los trasplantes de células germinales inmaduras a gónadas de la misma o distinta especie para completar la maduración hasta espermatozoide. El trasplante de espermatogonias humanas en testículo de ratón es todavía complejo. Esta técnica resolvería el problema de muchos pacientes con fallo de maduración de células germinales, o aquellos en los que se someten a técnicas agresivas que comprometan su fertilidad (p ej: radioterapia, quimioterapia, ...). La selección de una animal receptor adecuado es el primer paso necesario para el éxito del trasplante de espermatogonias humanas (19).

Es fundamental la selección de los pacientes e información correcta, para ello se intenta valorar distintos parámetros que informen de la posibilidad de éxito antes de la realización de esta técnica. Se propone la valoración de los transcritos 1 y 2 de protaminas (PRM1-mRNA y PRM2-mRNA) (6) y (42) realizar un screening molecular del cromosoma Y, para detectar posibles microdeleciones en él.

Por todo lo visto, se recomienda informar en detalle a los pacientes que se encuentran en esta situación, de lo experimental del tratamiento, debido a la incertidumbre pronóstica que acompaña a estos casos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Edwards R.G., Tarín JJ., Dean N et al.:** Are spermatic injections into human oocytes now mandatory?. Hum. Reprod 1994; 9: 2217-2219.
2. **Fishel S, Aslam I, Tesarik J.:** Spermatic conception: a stage too early, time too soon?. Hum. Reprod 1996; 11: 1371-1375.
3. **Tesarik J. and Mendoza M.:** Spermatic injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. Hum. Reprod 1996;11: 772-779.
4. **Ghazzawi I.M. et al.:** Reproductive capacity of round spermatic compared with mature spermatozoa in a population of azoospermic men. Hum.Reprod 1999;14: 736-740.
5. **Zech H, Vanderzwalmen et al.:** Congenital malformations after intracytoplasmic injection of spermatic. Hum. Reprod 2000; 15: 969-971.
6. **Steger K et al.:** Round spermatic from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. Hum. Reprod 2001; 16: 709-716.
7. **Francavilla S, Bianco M.A. et al.:** Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatic in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. Hum. Reprod 2001; 16: 1440-1448.
8. **Fishel S, Green S, Bishop M et al.:** Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatic Lancet 1995; 345: 1641-1642.
9. **Tesarik J and Sousa M.:** More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. Fertil. Steril 1995; 63: 343-349
10. **Tesarik J., Rolet F., Brami C. et al.:** Spermatic injection into human oocytes II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. Hum. Reprod 1996; 11: 780-783.
11. **Kim NH, Shin JS. et al.:** Fertilization and in vitro development of porcine oocytes followig intracytoplasmic injection of round spermatic or round spermatic nuclei. Theriogenology 1999; 51: 1441-1449.
12. **Tesarik J. and Mendoza M.:** The activity (calcium oscillator?) responsible for human oocyte activation after injection with round spermatic is associated with spermatic nuclei. Fertil. Steril 2000; 74: 1245-1247.
13. **Yanagida K., Yazawa H. et al.:** Oocyte activation induced by spermatic and the spermatozoa. Int. J. Androl., 23: Suppl 2000; 2: 63-65.
14. **Parrington J. et al.:** Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. Nature 1996; 25: 364-368.
15. **Strome S et al.:** Spindle Dynamics and the Role of (-Tubulin in Early Caenorhabditis elegans Embryos. Mol. Biol. Cell 2001; 12: 1751-1764.
16. **Bergman, Y. and Mostoslavsky, R.:** DNA demethylation: turning genes on. Biol. Chem 1998; 379: 401-407.
17. **Tayko, B. Trasler, J. and Bestor, T.:** Genomic imprinting: Gametic mechanisms and somatic consequences. J. Androl 1997; 8: 480-486.
18. **Kupker W. et al.:** Limitations of reproduction medicine in male subfertility. Treatment of severe spermaticogenesis disorders. Urologie A 1999; 38: 575-582.
19. **Tsai M.C. et al.:** Alternative sources of gametes: reality or science fiction?. Hum.Reprod 2000; 15: 988-998.
20. **Ogura A, Yanagimachi R.:** Round spermatic nuclei

- injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod. Genet* 1993; 11: 335-341.
21. **Sofikitis N, Miyagawa I et al.:** Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J. Assist. Reprod. Genet* 1994; 11: 335-341.
  22. **Sofikitis N.V., Toda T, Miyagawa i et al.:** Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil. Steril* 1996; 65: 176-185.
  23. **Yazawa H., Yanagida K and Sato A.:** Oocyte activation and Ca<sup>2+</sup> oscillation-inducing abilities of mouse round/elongated spermatids and the developmental capacities of embryos from spermatid injection. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 1221-1228.
  24. **Chen S-E, Ho H-N, Chen H-F et al:** Fertilization and embryo cleavage alter intracytoplasmic spermatid injection in an obstructive azoospermic patient with defective spermiogenesis. *Fertil. Steril* 1996; 66: 157-160.
  25. **Antinori S, Versaci C, Dani G et. al.:** Fertilization with human testicular spermatids: four successful pregnancies. *Hum. Reprod* 1997; 12: 286-291.
  26. **Antonori S, Versaci C, Dani G et al.:** Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatids into human oocytes. *Hum. Reprod* 1997; 12: 554-556.
  27. **Vanderzwalmen P. et al.:** Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum. Reprod* 1997; 12: 1203-1213.
  28. **Amer M, Soliman E, El-Sadek M et al.:** Is complete spermiogenesis failure indication for spermatid conception?. *Lancet* 1997; 350: 116.
  29. **Araki Y, Motoyama M, Yoshida A et al.:** Intracytoplasmic injection with late spermatids: a successful procedure in achieving childbirth for couples in which male partner suffers from azoospermia due to deficient spermatogenesis. *Fertil.Steril* 1997; 67:559-561.
  30. **Sofikitis N. et al.:** Micro-and macro-consequences of ooplasmic injections of early haploid male gametes. *Hum. Reprod* 1998; 4: 197-212.
  31. **Bernabeu R, Cremades N, Takahashi K and Sousa M.:** Successful pregnancy after spermatid injection. *Hum. Reprod* 1998; 13: 1898-1900.
  32. **Al-Hasani S., Ludwig M. et al.:** Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatid azoospermic patients. Results and review. *Hum. Reprod* 1999; 14: 97-107.
  33. **Levrán D. et al.:** Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest. *Fert. Steril*, 2000; 74: 443-447.
  34. **Vicdan K, Isik A.Z. and Delilbasi L.:** Development of blastocyst-stage embryos after round spermatid injection in patients with complete spermiogenesis failure. *Assist. Reprod. Genet* 2000; 18: 78-86.
  35. **Sousa M, Barros A, Katsuhiko T., Tesarik J. et al.:** Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum. Reprod* 1999; 14: 1279-1286.
  36. **Vanderzwalmen P. et al.:** The problems of espermatid microinjection in the human: the need for an accurate morphological approach and selective methods for viable and normal cells. *Hum. Reprod* 1998; 13: 515-519.
  37. **Tesarik J.:** Fertilization of oocytes by injected spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Rev. Reprod* 1996; 1: 149-152.
  38. **Sousa M, Mendoza C, Barros A and Tesarik J.:** Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes and round spermatids. *Mol. Hum. Reprod* 1996; 2: 853-857.
  39. **Tesarik J., Mendoza C. et al.:** In-vitro maturation of human male germ cells: a new treatment for maturation arrest at the primary spermatocyte stage. *Hum. Reprod* 1999; ESHRE 15: 33-34.
  40. **Cremades N, Sousa M, Bernabeu R and Barros A.:** Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum. Reprod* 2001;16: 1938-1994.
  41. **Cremades N, Bernabeu R, Sousa M and Barros A.:** In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum. Reprod* 1999; 14: 1287-1293.
  42. **Sousa M, Fernandes S y Barros A.:** Prognostic factors for successful testicle spermatid recover. *Mol. Cell Endocrinol* 2000; 15: 166 (1). 37-43.