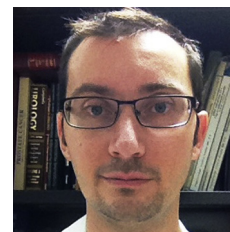


Extraction de sperme par biopsie testiculaire pour préservation de la fertilité en contexte néoplasique (onco-TESE) : pour qui et comment ?



L. Nison

Biopsy for testicular sperm extraction to preserve fertility in neoplastic context (onco-TESE): For whom and how?

L. Nison^a
F. Marcelli^{a,b}
J.-M. Rigot^b

^aService d'urologie, hôpital Huriez, CHRU de Lille, 1, place de Verdun, 59037 Lille, France

^bService d'andrologie, hôpital Calmette, CHRU de Lille, boulevard du Professeur-Leclercq, 59037 Lille, France

RÉSUMÉ

Objectif. – Mise au point sur la place de l'extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires (TESE) en amont de tout traitement anticancéreux potentiellement gonadotoxique (onco-TESE) dans la stratégie de préservation de la fertilité en contexte néoplasique.

Méthode. – Rappel du principe, des indications et de la technique de l'onco-TESE basé sur l'analyse de la littérature et l'expérience personnelle de l'auteur.

Résultats. – L'incidence des cancers de l'homme jeune (testicule, lymphome) est en augmentation. Les prises en charges actuelles alliant chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie permettent une amélioration des taux de survie mais peuvent induire une stérilité. L'extraction chirurgicale de sperme testiculaire en amont de tout traitement à visée oncologique (onco-TESE) est proposée en cas d'impossibilité de réalisation d'une autoconservation. Elle permet de s'affranchir de la gonadotoxicité des thérapeutiques et augmente les taux de cryoconservation chez les patients ayant une azoospermie lors de la découverte du cancer. Facilement réalisable au décours d'une chirurgie testiculaire (ou de la mise en place d'une chambre implantable), elle ne retarde pas l'initiation d'un traitement à visée oncologique.

Conclusion. – Ces éléments doivent inciter les urologues et oncologues à proposer l'onco-TESE à leurs patients en cas d'échec d'autoconservation afin de leur offrir via l'assistance médicale à la procréation les meilleures chances de paternité.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

SUMMARY

Objective. – Focus on the place of surgical testicular sperm extraction (TESE) prior to any potentially gonadotoxic cancer therapy (Onco-TESE) in the fertility preservation strategy in neoplastic context.

Method. – Reminder principle, indications and technique of onco-TESE based on the analysis of the literature and personal experience of the author.

Results. – The incidence of young men cancers (testicular, lymphoma) is growing. The current treatment combining surgery, radiotherapy or chemotherapy permits an improvement in survival rate but can induce infertility. The surgical testicular sperm extraction prior to any oncological therapy (Onco-TESE) is proposed in case of impossibility of performing a self-preservation. It eliminates the therapeutic gonadotoxicity and increases the rates of cryopreservation in patients with azoospermia when discovering cancer. Easily achievable with the waning of a testicular

MOTS CLÉS

Cancer du testicule
Onco-TESE
Oligospermie
Fertilité

KEYWORDS

Testicular neoplasms
Onco-TESE
Oligospermia
Fertility

Auteur correspondant :

L. Nison,
Service d'urologie, hôpital Huriez,
CHRU de Lille, 1, place de
Verdun, 59037 Lille, France.
Adresse e-mail :
laurent_nison@msn.com



surgery (or the establishment of an implantable chamber), it does not delay the initiation of oncological treatment. Conclusion. – These data should encourage urologists and oncologists to propose the onco-TESE to their patients in case of failure of self-preservation so as to offer them better chances of paternity via medically assisted procreation.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

INTRODUCTION

De récentes études épidémiologiques indiquent une augmentation de 25 à 35 % de l'incidence des cancers de l'homme jeune sur les 30 dernières années [1]. Entre 15 et 40 ans, les plus représentés sont les cancers du testicule et les lymphomes [2]. Si les traitements par radio- et/ou chimiothérapies utilisés en 1^{re} intention ou en adjuvant permettent d'obtenir pour ces cancers une survie spécifique à 5 ans de plus de 80 % [2,3], ils peuvent également induire un effet gonadotoxique d'intensité et de durée difficilement prévisibles. Ainsi, l'infertilité permanente retrouvée après prise en charge d'un cancer testiculaire atteindrait selon les séries 30 à 63 % des cas [4,5]. Depuis le plan cancer de 2013, l'autoconservation de sperme par 2 recueils au Centre d'études et de conservation des œufs et du sperme humain (CECOS) est recommandée avant l'initiation d'un traitement anticancéreux potentiellement stérilisant et avant toute orchidectomie.

Cependant, la qualité de la spermatogenèse primaire peut être altérée par des facteurs innés (dysfonction endocrinienne, trouble du développement urogénital) ou environnementaux. Elle peut également l'être en raison de perturbations biochimiques ou hormonales liées au cancer (hyperthermie, hyperestrogénie induite par sécrétion tumorale d'HCG, hyper-sécrétion d'IL1-6 ou TNF α) [6,7]. Raman et al. [8] ont montré une incidence du cancer du testicule 20 fois plus importante dans la population d'hommes suivis pour infertilité que dans la population générale. Ainsi, des anomalies du spermogramme seraient retrouvées chez 20 à 45 % des patients atteints de cancer du testicule [4,9] et jusqu'à 70 % pour les patients présentant un Lymphome Hodgkinien [7]. L'azoospermie ne permettant pas une autoconservation au moment du diagnostic représenterait 3 à 20 % des cas [7,9].

Cette problématique est d'autant plus importante qu'elle touche une population d'hommes jeunes n'ayant pas débuté (ou achevé) de projet familial. Les biopsies testiculaires par abord chirurgical pour extraction de spermatozoïdes (TESE), déjà réalisées en cas d'azoospermies non liées à un contexte tumoral, ont également été proposées en cas d'azoospermie secondaire post-chimiothérapie [10,11]. La question posée ici est celle de la place de la TESE en amont de tout traitement anticancéreux potentiellement gonadotoxique (onco-TESE) dans la stratégie de préservation de la fertilité dans ce contexte néoplasique.

INTÉRÊT DE L'ONCO-TESE

La réalisation d'une onco-TESE permet, grâce à la cryoconservation de cellules germinales, un recours ultérieur aux techniques d'aide médicale à la procréation (AMP). Elle peut également améliorer la qualité de vie des patients confrontés à une situation néoplasique en réduisant :

- leurs doutes sur la fertilité ultérieure et ce d'autant plus qu'ils ont été confrontés à un échec d'autoconservation ;

- leurs inquiétudes vis-à-vis d'un risque théorique de tératogénicité sur la descendance qui, même s'il n'a pas été clairement démontré chez l'homme, a été mis en évidence sur des modèles animaux, notamment par l'équipe de Trasler [12].

De plus, sa réalisation au moment de l'orchidectomie, de la mise en place d'une chambre implantable ou d'une biopsie médullaire, n'induit pas de retard de prise en charge oncologique [13].

INDICATIONS

Les patients pour lesquels l'onco-TESE doit être proposée sont ceux dont l'autoconservation par masturbation avant le début de la prise en charge oncologique n'a pas permis l'obtention de spermatozoïdes ou ceux pour lesquels ce recueil ne pourra plus être réalisé après traitement. Les cas de figures les plus rencontrés sont :

- les azoospermies obstructives et non obstructives, primitives ou secondaires (induites par le syndrome tumoral et/ou des thérapeutiques antérieures) ;
- les chirurgies conduisant à l'anorchidie : atteintes bilatérales synchrones, métachrones après antécédent d'orchidectomie ou sur testicule unique ;
- lorsque les thérapeutiques envisagées revêtent un caractère d'urgence ne permettant pas la réalisation d'une autoconservation ;
- lorsque l'éjaculation (spontanée ou par techniques médicales) n'a pas pu être obtenue lors de plusieurs tentatives de recueil.

TECHNIQUE DE L'ONCO-TESE

Prélèvement chirurgical

Le prélèvement chirurgical de pulpe testiculaire est réalisé sous anesthésie générale ou rachianesthésie. Lorsque le patient est traité pour cancer du testicule, cette procédure est associée à l'orchidectomie et l'abord chirurgical se fait alors par voie inguinale. En cas d'indication de chirurgie conservatrice (testicule unique avec lésion occupant moins de 30 à 50 % du volume ou tumeur infracentimétrique), les règles techniques de la chirurgie partielle sont appliquées [14]. On réalise alors un abord inguinal avec clampage réversible des vaisseaux en respectant le déférent. Le testicule est extériorisé isolé dans un champ opératoire afin d'éviter tout risque de dissémination. Dans notre équipe, nous ne réalisons pas de refroidissement testiculaire. La lésion est localisée par palpation digitale et repérage échoguidé à l'aiguille (Fig. 1). L'albuginée est incisée en regard de la tumeur qui est réséquée avec une marge de sécurité. Le prélèvement à visée d'extraction de spermatozoïdes est réalisé sur le testicule homolatéral en zone saine. Si l'onco-TESE n'ajoute pas de

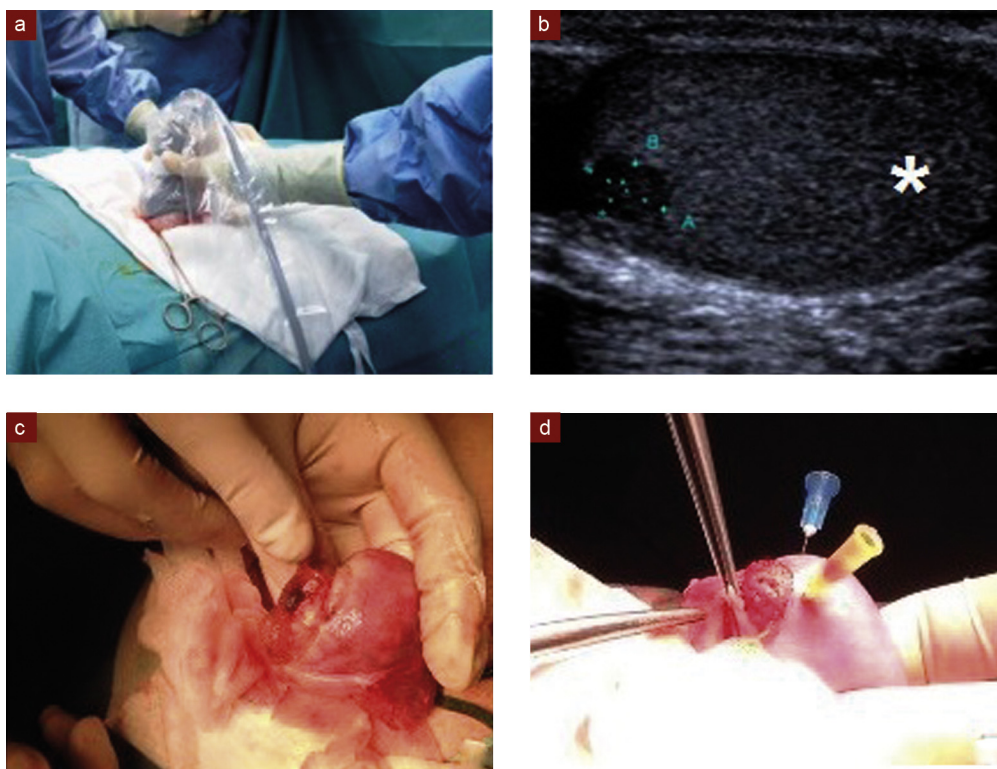


Figure 1. Technique chirurgicale de l'extraction de sperme par biopsie testiculaire : a : repérage échographique ; b : lésion tumorale et site de TESE (*) ; c : ouverture de l'albuginée ; d : prélèvement de pulpe.

morbidité supplémentaire en cas d'orchidectomie, elle peut en cas de chirurgie conservatrice se compliquer d'un hématome parenchymateux ou d'une atteinte vasculaire nourricière pouvant conduire à une atrophie testiculaire [15]. Afin de limiter ce risque, nous privilégions dans notre centre un site de prélèvement unique et ne réalisons pas systématiquement d'abord controlatéral. En revanche, l'onco-TESE peut être proposée sur le testicule controlatéral lorsqu'il est envisagé une biopsie à visée histologique pour documenter la présence de microcalcifications ou dans l'impossibilité de prélever de la pulpe saine du côté tumoral. En cas de néoplasie extratesticulaire le prélèvement se fera alors par une scrototomie transverse de 2 cm en regard du testicule de volume le plus important sur l'évaluation échographique préopératoire. Après ouverture de la vaginale et incision de l'albuginée, on exprime manuellement la pulpe testiculaire qui sera sectionnée aux ciseaux fins. La fermeture de l'albuginée et de la vaginale est effectuée par surjet de fil résorbable tressé 3/0 et celle de la peau par points séparés de fil tressé à résorption rapide 3/0.

Une microdissection des tubes séminipares peropératoire au microscope (micro-TESE) est réalisée dans certains centres et a été décrite dans le contexte de l'onco-TESE [16–18]. En effet, les tubes séminipares plus larges et opaques sont ceux présentant une spermatogenèse plus importante. Cette technique permettrait de limiter les volumes tissulaires prélevés mais présenterait un risque d'hématome plus important d'autant plus délétère en cas de testicule unique.

Les fragments de pulpe testiculaire sont adressés dans les meilleurs délais, dans une cupule stérile remplie d'un milieu de

conservation (Ferticult®) à température ambiante, au laboratoire de biologie de la reproduction pour l'extraction des spermatozoïdes. Le tissu prélevé ne doit pas être déposé sur une compresse qui risquerait d'absorber par capillarité une partie du matériel exploitable. En cas de chirurgie conservatrice, un fragment de quelques mm³ est également prélevé et destiné au service d'anatomopathologie pour analyse de l'histologie fonctionnelle de la spermatogenèse et pour la recherche d'une néoplasie germinale intratubulaire éventuelle.

Traitement de la biopsie testiculaire au laboratoire de biologie de la reproduction

Le tissu testiculaire, placé dans une boîte de pétri contenant un milieu de conservation, est dilacéré mécaniquement à l'aide de scalpels (Fig. 2a) ou par digestion enzymatique (collagénases) selon les équipes. Il est ensuite soumis à une centrifugation (Fig. 2b–d). Cette technique permet de dissocier les cellules somatiques des cellules germinales [19]. Après élimination du surnageant, un échantillon du culot, auquel est ajouté du milieu de conservation, est examiné au microscope inversé à contraste de phase à la recherche de spermatozoïdes. Leur numération, vitalité, morphologie et mobilité sont alors évaluées. Si le nombre de spermatozoïdes vivant est suffisant, la préparation sera conditionnée en pailles. Celles-ci seront placées dans un automate qui abaissera leur température jusqu'à -180°C avant d'être stockées dans une cuve d'azote liquide en attente d'une procédure de fécondation in vitro avec micro-injection intracytoplasmique (ICSI).

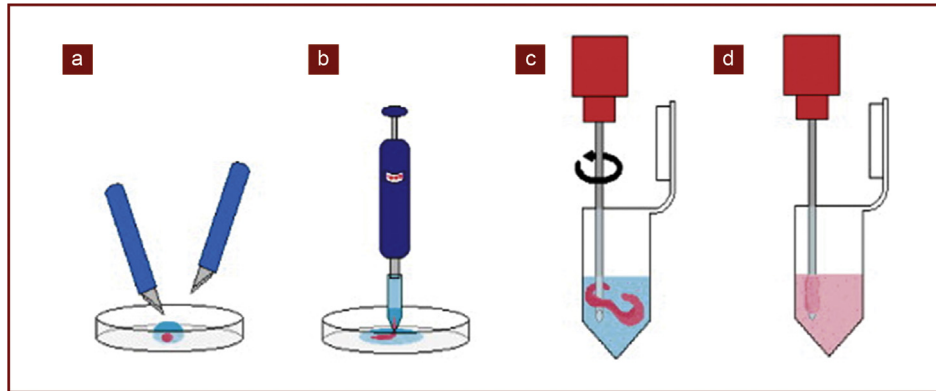


Figure 2. Étapes du traitement de la pulpe testiculaire au laboratoire de biologie de la reproduction. D'après Robin et al. [19].

Tableau I. Principaux résultats de la littérature de 2000 à 2015.

	Effectif	Type de cancer	Nombre de prélèvements positifs (%)
Baniel et al., 2000 [21]	3	2 TGS/1 lymphome	3
Köhn et al., 2001 [22]	1	TGS	1
Schrader et al., 2003 [13]	31	8 TGS/6 TGNS/17 lymphomes	14 (45)
Binsaleh et al., 2004 [17]	2	2 leydigiomes	1
Choi et al., 2005 [16]	2	TGS	2
Carmignani et al., 2007 [20]	4	2 TGS/2 leydigiomes	3
Modder et al., 2007 [23]	6	5 TGS/1 lymphome	5 (83)
Descombe et al., 2008 [24]	2	1 TGNS/1 TGS	2
Hallak et al., 2009 [18]	5	1 TGS/4 leydigiomes	4 (80)
Safsaf et al., 2011 [29]	1	TGS bilatérale	1
Furuhashi et al., 2013 [25]	6	3 TGS/2 TGNS/1 leydigiome	4 (67)
Haddad et al., 2014 [26]	1	TGS	1
Berookhim et al., 2014 [28]	39	TGS, TGNS, sarcomes, lymphomes,	16 (41)
Roque et al., 2015 [27]	1	TGS	1
Total	104	27 TGS, 9 TGNS 19 lymphomes, 7 leydigiomes 39 non précisés	58 (56)

TGS : tumeur germinale séminomateuse ; TGNS : tumeur germinale non séminomateuse.

DISCUSSION

La littérature évaluant les résultats de la biopsie testiculaire pour des patients azoospermes avant prise en charge oncologique est rare et d'un faible niveau de preuve. La majorité des équipes rapportent une expérience limitée (1 à 6 patients). La recherche sur les bases de données bibliographiques PubMed et Science Direct concernant la période 2000–2015 (Tableau I) retrouve 14 publications pour un nombre total de 104 patients (majoritairement traités pour cancer du testicule) [13,16–18,20–29]. Le taux d'extraction positif global calculé est de 55,8 %. Ces résultats similaires à ceux obtenus en cas

d'azoospermie (toutes causes confondues) [30] restent à interpréter avec réserve. En effet, les équipes ne réalisent pas toutes le même protocole de biopsie. La technique (TESE, micro-TESE) et le nombre de prélèvements ne font l'objet d'aucun consensus ; de même que le site (certains centres privilégiant un abord controlatéral à l'atteinte tumorale). De plus, les informations concernant les causes d'azoospermies n'ont pas été systématiquement renseignées. Si les résultats de la micro-TESE semblent supérieurs à ceux de l'onco-TESE, en cas d'azoospermie non obstructive [31], il n'y a actuellement pas suffisamment de données permettant de recommander une méthode plutôt qu'une autre. Néanmoins, la spécificité

de la technique de micro-TESE implique que ce geste doit être réservé aux urologues qui en ont l'expérience.

Onze grossesses pour 16 tentatives d'ICSI ont été rapportées, soit un taux calculé de succès de 68,75 % [13,16–18,20,21,24,25,27].

Une des études ayant le plus grand effectif ($n = 31$), menée par l'équipe de Schrader [13], comporte 14 patients atteints d'une tumeur du testicule (8 TGS et 6 TGNS) et 17 patients présentant un lymphome. Les taux d'extraction positive retrouvés sont respectivement pour ces 2 indications de 42,9 % et 47 % comparables aux résultats rapportés par Beroukim et al. (41 %, $n = 39$) [28]. L'étude histologique ne montrait pas de lien entre le type de cancer testiculaire et la sévérité de l'atteinte de la spermatogenèse, mais révélait une corrélation avec l'avancée du stade tumoral.

L'onco-TESE a également été réalisée dans la population de patients adolescents ayant débuté leur puberté [28]. L'âge moyen des 18 adolescents ayant bénéficié de cette procédure était de 16 ans avec un taux d'extraction positive de 38,8 %. Les taux de succès étaient plus importants pour les stades pubertaires avancés (stades 4 et 5 de la classification de Tanner). L'utilisation des spermatozoïdes cryopréservés pour ICSI reste dépendante des règles de bonne pratique de la PMA. Le projet de parentalité devra être analysé au sein du couple, en tenant compte de l'évolution oncologique du patient. La qualité de la spermatogenèse après traitement devra être réévaluée par de nouveaux spermogrammes afin de confirmer la nécessité d'une mesure d'AMP. Enfin, une évaluation génétique demeure indispensable pour compléter le bilan étiologique de l'infertilité.

CONCLUSION

La préservation de la fertilité débute dès l'instauration de la prise en charge oncologique. L'onco-TESE représente l'alternative de recours si la cryopréservation est impossible. Elle répond aux règles de l'extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires. Sa faisabilité et sa sécurité oncologique sont démontrées par des études de cohortes. Reste parfois la problématique de sa réalisation nécessitant d'avoir recours à un centre agréé mais sa diffusion mérite néanmoins d'être connue et reconnue des acteurs du domaine oncologique.

Points essentiels

- L'onco-TESE consiste à prélever de la pulpe testiculaire pour extraction de spermatozoïdes avant l'initiation d'un traitement anticancéreux potentiellement stérilisant.
- Sa simplicité et sa faible morbidité en font une technique à proposer en cas d'échec d'autoconservation.
- L'abord est inguinal en cas de cancer du testicule ou par scrototomie en cas de cancer de localisation autre.
- Réalisée pendant l'orchidectomie ou la mise en place d'une chambre implantable, elle n'induit pas de retard de prise en charge oncologique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

ANNEXE 1. LIEN POUR LA FICHE D'INFORMATION PATIENT DU SITE UROFRANCE

<http://www.urofrance.org/fileadmin/documents/data/FI/2012/prelevement-de-spermatozoïdes/prelevement-de-spermatozoïdes.pdf>.

RÉFÉRENCES

- [1] Le Cornet C, Lortet-Tieulent J, Forman D, et al. Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *Eur J Cancer* 2014;50:831–9.
- [2] Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. *Med Pediatr Oncol* 2002;38:1–10.
- [3] Durand X, Rigaud J, Avancès C, et al. CCAFU recommendations 2013: testicular germ cell cancer. *Prog Urol* 2013;23 (Suppl. 2):S145–60.
- [4] Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, et al. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol* 2007;52(2):355–67.
- [5] Huddart RA, Norman A, Moynihan C, et al. Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer. *Br J Cancer* 2005;93(2):200–7.
- [6] Hayashi T, Arai G, Hyochi N, et al. Suppression of spermatogenesis in ipsilateral and contralateral testicular tissues in patients with seminoma by human chorionic gonadotropin beta subunit. *Urology* 2001;58(2):251–7.
- [7] Rueffer U, Breuer K, Josting A, et al. Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* 2001;12:1307–11.
- [8] Raman JD, Nobert CF, Goldstein M, et al. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol* 2005;174(5):1819–22.
- [9] Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, et al. The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl* 2012;33 (6):1394–401.
- [10] Meseguer M, Garrido N, Remohí J, et al. Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;18:1281–5.
- [11] Chan PT, Palermo GD, Veeck LL, et al. Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmic sperm injection in the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy. *Cancer* 2001;92:1632–7.
- [12] Trasler JM, Hales BF, Robaire B. Paternal cyclo-phosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature* 1985;316:144–6.
- [13] Schrader M, Muller M, Sofikitis N, et al. "Onco-tese": testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy—new guidelines? *Urology* 2003;61:421–5.
- [14] Durand X, Ferretti L, Desfemmes FR, et al. Chirurgie conservatrice du testicule pour tumeur : à qui et comment ? *Prog Urol* 2012;22:F48–51.



- [15] Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997;12:1688–92.
- [16] Choi BB, Goldstein M, Moomjy M, et al. Births using sperm retrieved via immediate microdissection of a solitary testis with cancer. *Fertil Steril* 2005;84:1508.
- [17] Binsaleh S, Sircar K, Chan PT. Feasibility of simultaneous testicular microdissection for sperm retrieval and ipsilateral testicular tumor resection in azoospermic men. *J Androl* 2004;25:867–71.
- [18] Hallak J, Cocuzza M, Sarkis AS, et al. Organ-sparing microsurgical resection of incidental testicular tumors plus microdissection for sperm extraction and cryopreservation in azoospermic patients: surgical aspects and technical refinements. *Urology* 2009;73:887–91.
- [19] Robin G, Boitrelle F, Leroy X, et al. Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis. *Ann Pathol* 2010;30(3):182–95.
- [20] Carmignani L, Gadda F, Gazzano G, et al. Testicular sperm extraction in cancerous testicle in patients with azoospermia: a case report. *Hum Reprod* 2007;22(4):1068–72.
- [21] Baniel J, Sella A. Sperm extraction at orchiectomy for testis cancer. *Fertil Steril* 2001;75:260–2.
- [22] Köhn F-M, Schroeder-Printzen I, Weidner W, et al. Testicular sperm extraction in a patient with metachronous bilateral testicular cancer. Case report. *Hum Reprod* 2001;16:2343–6.
- [23] Modder JK, Kohler T, Brannigan RE. Fertility preservation: outcomes for Onco-TESE in male cancer patients prior to oncological therapy. *Fertil Steril* 2007;88(Suppl. 1):S393–4.
- [24] Descombe L, Chauleur C, Gentil-Perret A, et al. Testicular sperm extraction in a single cancerous testicle in patients with azoospermia: a case report. *Fertil Steril* 2008;90:443.
- [25] Furuhashi K, Ishikawa T, Hashimoto H, et al. Onco-testicular sperm extraction: testicular sperm extraction in azoospermic and very severely oligozoospermic cancer patients. *Andrologia* 2013;45:107–10.
- [26] Haddad N, Al-Rabeeh K, Onerheim R, et al. Is ex vivo microdissection testicular sperm extraction indicated for infertile men undergoing radical orchiectomy for testicular cancer? Case report and literature review. *Fertil Steril* 2014;101:956–9.
- [27] Roque M, Sampaio M, de Oliveira Salles PG, et al. Onco-testicular sperm extraction: birth of a healthy baby after fertility preservation in synchronous bilateral testicular cancer and azoospermia. *Andrologia* 2015;47:482–5.
- [28] Berookhim BM, Mulhall JP. Outcomes of operative sperm retrieval strategies for fertility preservation among males scheduled to undergo cancer treatment. *Fertil Steril* 2014;101(3):805–11.
- [29] Safsaf A, Sibert L, Cleret JM. Concomitant unilateral and synchronous bilateral testis cancer in azoospermic dizygotic twins: differential management of fertility preservation. *Fertil Steril* 2011;95(7):2434e11–1.
- [30] Shin DH, Turek PJ. Sperm retrieval techniques. *Nat Rev Urol* 2013;10(12):723–30.
- [31] Deruyver Y, Vanderschueren D, Van der Aa F. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review. *Andrology* 2014;2(1):20–4.