

ORIGINAL

Criopreservação e biópsia testicular: análise de resultados

Ilda Pires^a, Helena Figueiredo^a, Luís Ferraz^b, Helena Serra^a, António Barbosa^a, Eduarda Felgueira^a e Angelina Tavares^a

^aUnidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia. Vila Nova de Gaia. Portugal.

^bServiço de Urologia. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia. Vila Nova de Gaia. Portugal.

RESUMO

Introdução: A injecção intracitoplasmática (ICSI) realizada com espermatozóides provenientes do testículo tem sido efectuada em homens azoospérmicos, obtendo-se resultados comparáveis aos obtidos com espermatozóides provenientes do ejaculado. A realização da biópsia testicular extractiva (TESE) na altura da punção folicular (PF) é extremamente desgastante para o casal. Além disso, a repetição da TESE em subsequentes ICSI pode causar danos no testículo, daí que sempre que possível se proceda à criopreservação do produto testicular para uso futuro. O objectivo deste estudo foi averiguar se a criopreservação afecta negativamente o potencial de fertilização de espermatozóides de origem testicular em homens azoospérmicos.

Material e métodos: A primeira parte do estudo analisou retrospectivamente 136 ciclos de factor masculino isolado. A ICSI foi realizada com espermatozóides testiculares móveis colhidos a fresco (grupo I, n = 86) ou previamente criopreservados (grupo II, n = 50). A segunda fase do trabalho centrou-se num subgrupo de 24 casais que realizou 27 ciclos ICSI com espermatozóides testiculares colhidos a fresco (grupo I') e 40 ciclos com espermatozóides previamente criopreservados (grupo II'). Foram avaliadas as taxas de fertilização, implantação e gravidez clínica por transferência.

Resultados: A taxa de fertilização normal no grupo I e grupo II foi de 50,2% e 49,0%, respectivamente. A taxa de implantação (14,7% e 19,3%) e a taxa de gravidez clínica por transferência (25,7% e 27,3%) foi semelhante entre os dois grupos. Na segunda parte do estudo a taxa de fertilização normal foi semelhante nos dois grupos (57,9% e 51,0%), mas a taxa de implantação (2,2% *versus* 16,7%) e taxa de gravidez clínica por transferência (3,9% *versus* 23,5%) foi significativamente inferior com espermatozóides testiculares colhidos a fresco ($p < 0,025$; $p < 0,05$).

Conclusões: A criopreservação de espermatozóides testiculares é uma técnica fácil e os resultados de ICSI com espermatozóides previamente criopreservados são similares àqueles obtidos com espermatozóides colhidos a fresco. A criopreservação pode evitar a repetição de biópsias testiculares em ciclos sucessivos de ICSI em pacientes com azoospermia, sem comprometer o sucesso do tratamento.

Palavras-chave: Criopreservação. ICSI. Azoospermia. Biópsia testicular extractiva.

Correspondência: Dra. Ilda Pires.

Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia. Unidade II. Rua Dr. Francisco Sá Carneiro. 4400-129 Vila Nova de Gaia. Portugal.

ABSTRACT

Criopreservation and testicular biopsy: results analysis

Introduction: Intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) realized with testicular sperm has been done in azoospermic men with similar results of those obtained with ejaculated sperm. The accomplishment of testicular sperm extraction (TESE) at the time of follicular pick-up is extremely stressing for the couple. Moreover, the repetition of TESE in subsequent ICSIs can cause damages in the testicle, and when it is possible the criopreservation of testicular tissue is proceed for future use. The objective of this study was to determine if the cryopreservation affects negatively the fertilization potential of testicular sperm in azoospermic men.

Material and methods: The first part of the study analysed retrospectively 136 ICSI cycles of male factor only. ICSI was realized with motile fresh testicular sperm (Group I, n = 86) or frozen-thawed sperm (Group II, n = 50). The second part focused on a subgroup of 24 couples who underwent 27 ICSI cycles with fresh (Group I') and 40 cycles with frozen-thawed testicular sperm (Group II'). Fertilization, implantation and pregnancy rates were evaluated.

Results: Fertilization rate in Group I and Group II was 50.2% and 49.0%, respectively. Implantation rate (14.7% and 19.3%) and clinical pregnancy rate per transfer (25.7% and 27.3%) were similar for both groups. In the second part of the study fertilization rate was similar between the two groups (57.9% and 51.0%), but implantation (2.2% *versus* 16.7%) and clinical pregnancy rate per transfer (3.9% *versus* 23.5%) were significantly lower with fresh testicular sperm ($p < 0.025$; $p < 0.05$).

Conclusions: Cryopreservation of testicular sperm is feasible and the results of ICSI with frozen-thawed testicular sperm are similar to those obtained using fresh testicular sperm. Cryopreservation may avoid repetition of testicular biopsies to retrieve sperm for successive ICSI cycles in patients with azoospermia, without compromising the success of the treatment.

Key words: Cryopreservation. ICSI. Azoospermia. Testicular sperm extraction.

INTRODUÇÃO

Há uma década atrás a única possibilidade realística de concepção para casais em que o homem apresentava azoospermia ou oligoastenoteratozoospermia grave, era o recurso a espermatozóides de dador. A introdução da ICSI por Palermo et al¹ revolucionou o modo como se abordava o factor masculino. Estes autores mostraram taxas de fertilização e implantação elevadas em casais previamente não aceites para FIV ou que tiveram ciclos de FIV com falha de fertilização^{2,3}. A ICSI tornou-se assim, o procedimento de eleição para a abordagem do factor masculino grave, tendo sido igualmente utilizada com espermatozóides provenientes do testículo, obtendo-se taxas de fertilização e taxas de implantação comparáveis às obtidas com espermatozóides provenientes do ejaculado⁴⁻⁶.

A técnica da extração de espermatozóides do testículo (TESE) foi descrita pela primeira vez por Schoysman et al⁷ e Craft et al⁸ para casos de azoospermia obstrutiva (AO). Posteriormente Silber et al⁹ e Devroey et al¹⁰ descreveram a aplicação da TESE⁴ a casos de azoospermia não obstrutiva (ANO). Desde essa altura a TESE, juntamente com a ICSI tem sido o procedimento de eleição tanto para a AO, como para a ANO. O procedimento da TESE na altura da colheita dos ovócitos é extremamente desgastante para o casal. Além disso a repetição de biópsias em subsequentes ciclos pode causar processos inflamatórios, alterações da vascularização, calcificações¹¹ e, possivelmente, danos sérios na espermatogénese, daí que, sempre que possível, se procede à criopreservação do produto testicular para uso futuro.

A criopreservação de espermatozóides testiculares tem sido usada com sucesso desde há vários anos, sendo particularmente importante nos casos de volume testicular reduzido, nos quais biópsias múltiplas podem representar uma perda significativa de massa testicular.

A combinação de biópsia testicular prévia com a criopreservação permite a realização de ciclos de ICSI adicionais, sem a repetição da biópsia e sem a necessidade de sincronização com a estimulação ovárica e PF. Apesar de nos casos de AO ser normalmente recolhido um maior número de espermatozóides móveis do que nos casos de ANO, tanto num caso como outro, normalmente a quantidade recolhida permite que se realize a criopreservação de tecido testicular. Nos casos de ANO a criopreservação bem sucedida permite que se possa realizar biópsias dirigidas e não apenas diagnósticas.

A maioria de ciclos ICSI realizados tanto com espermatozóides frescos como previamente criopreser-

vados, em situações de AO ou ANO, apresentam taxas de fertilização e gravidez aceitáveis. A maioria dos estudos relata que os resultados não pioraram significativamente após a criopreservação de espermatozóides provenientes do testículo^{9,12-24}, incluindo aqueles estudos que compararam os resultados de um mesmo grupo de pacientes que realizou ciclos de ICSI com espermatozóides frescos e criopreservados^{14,25-28}. Outros, no entanto, mostraram diminuição da taxa de fertilização^{29,30}, taxa de gravidez clínica^{31,32} e taxa de implantação^{29,32} usando espermatozóides criopreservados.

O objectivo do nosso estudo foi apresentar os dados de ciclos ICSI com factor masculino isolado (azoospermia) usando espermatozóides colhidos por TESE e comparar os resultados usando espermatozóides colhidos a fresco *versus* espermatozóides previamente criopreservados. Numa segunda fase foi efectuada a comparação dos resultados num subgrupo de casais que realizaram ciclos ICSI-TESE tanto com espermatozóides colhidos a fresco, como previamente criopreservados.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo

A análise retrospectiva envolveu 136 ciclos de ICSI realizados entre Julho de 1997 e Abril de 2006, em 81 casais com factor masculino isolado (azoospermia), com espermatozóides colhidos por TESE realizada aquando da PF (grupo I; n = 86) ou previamente à PF (grupo II; n = 50). Foram identificados 59 casais de AO (99 ciclos) e 22 casais de ANO (37 ciclos).

Previamente à ICSI os homens foram avaliados pela equipa de Andrologia para determinar a etiologia da azoospermia através da história clínica, exame físico, estudo hormonal (FSH, LH, TT, TL, PRL), espermograma, cariótipo do sangue periférico, estudo molecular das microdelecções do cromossoma Y, e quando apropriado, biópsia testicular diagnóstica, ecografia e análise das mutações mais frequentes do gene da fibrose cística. A hipótese de criptozoospermia foi descartada pela ausência de espermatozóides após centrifugação em dois espermogramas consecutivos.

De acordo com Amer et al³³, sempre que houve a necessidade de repetir a biópsia no mesmo testículo, esta foi sempre realizada após pelo menos seis meses, de modo a evitar danos intratesticulares permanentes e optimizar a hipótese de encontrar espermatozóides.

Foi obtido consentimento informado para a realização da ICSI em todos os casais.

Estimulação ovárica e PF

A colheita dos ovócitos foi realizada após dessensibilização pituitária através de protocolo longo (n = 104) com agonistas da GnRH (Suprefact®, Hoeport) ou protocolo curto (n = 32) com antagonistas da GnRH (Cetrotide®, Serono ou Orgalutran®, Organon), seguida de estimulação ovárica com gonadotrofinas (Gonal F®, Serono ou Puregon®, Organon). Quando o folículo dominante atingiu um diâmetro igual ou superior a 18 mm, com uma concentração de estradiol de 200-300 pg/ml por folículo maduro, foi administrada uma dose de 10.000 IU/l de hCG (Pregnyl®, Organon) para induzir a maturação final do folículo/ovócito. A PF foi realizada sob controlo ecográfico vaginal 34-36h após a administração da hCG.

Biópsia testicular e ICSI

A polpa testicular foi colhida por TESE sob anestesia local conseguida com 5-6 ml de mistura de 1:1 1% lidocaína (Xiloacaina 2% sem adrenalina, Braun) e 0,5% bupivacaína (Marcaína 0,5% sem adrenalina, Braun) em regime de ambulatório.

Após imobilização do testículo, efectuou-se uma incisão de cerca de 1 cm numa região avascularizada do escroto, atravessando a túnica vaginalis e túnica albugínea. Uma porção da polpa extrudida foi lavada em meio Sperm Preparation Medium® (SPM) (Medicult) e colocada numa placa de Petri contendo 1-3 ml de SPM, onde foi fragmentada e macerada com lâminas de bisturi. Pequenos fragmentos de polpa foram sendo colhidas em diferentes áreas do mesmo testículo e também no contralateral até se encontrarem espermatozoides. No máximo foram colhidos 6 fragmentos do mesmo testículo.

A pesquisa de espermatozoides foi efectuada num microscópio invertido (Diaphot 330, Nikon) equipado com ópticas de Hooffman e platina aquecida na ampliação de 400x. Em todos os casos foram encontrados espermatozoides móveis. A suspensão foi lavada com 1-2 ml de SPM® e incubada em tubo cônico a 37 °C e 5% CO₂. Imediatamente antes da ICSI, o pellet foi centrifugado a 200 g durante 10 minutos, após o que foi ressuspensido em 50-100 µl de SPM® e incubado a 37 °C e 5% CO₂, durante pelo menos 30 minutos. A identificação e imobilização dos espermatozoides foi realizada em micropipetas sobre parafina (Medicult).

A ICSI foi realizada mediante protocolo convencional². Após a remoção das células do cumulus e corona, foi efectuada uma avaliação dos ovócitos de modo a serem apenas injetados os ovócitos em metafase II.

A fertilização foi avaliada no dia seguinte, 16-18 h após a ICSI e confirmada pela presença de dois pronúcleos (PN) distintos.

Criopreservação e descongelação da polpa testicular

Para a realização da criopreservação a suspensão testicular foi diluída em igual volume de Sperm Freezing Medium (Medicult), colocada em tubos/palhetas durante 10 min e em vapores de azoto líquido (N2L) durante 30 min, antes de ser submersa e armazenada em N2L. A descongelação foi efectuada colocando o tubo/palheta sobre água corrente durante 5 minutos e o sedimento foi preparado como acima descrito.

Cultura de embriões, transferência (TE) e detecção da gravidez

A qualidade embrionária foi avaliada diariamente até ao dia da TE, mediante a morfologia dos PN, tamanho, número e forma dos blastómeros, grau de fragmentação, aspecto da zona pelúcida e espaço perivitelino. Foram transferidos 2-3 embriões entre 2-5 dias após PF, consoante o número/qualidade dos embriões e idade da mulher. Foi administrada progesterona intravaginal para suporte luteínico (3 × 200 mg/dia; Utrogestan®, Jaba) a partir do dia da PF até à 12.^a semana de gestação, se apropriado.

A detecção da gravidez foi efectuada por doseamento de β-HCG plasmática no 16.^º dia após PF. A gravidez clínica foi confirmada pela observação de saco gestacional à 6.^a semana por ultra-sonografia. A taxa de implantação foi calculada pela razão entre o número de sacos observados e o número de embriões transferidos.

Análise de resultados

Foi efectuada análise estatística usando o teste de t-Student e χ^2 , sempre que apropriado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

No total foram realizados 86 e 50 ciclos usando, respectivamente, espermatozoides do testículo colhidos a fresco e previamente criopreservados (fig. 1). A idade da mulher, idade do homem, anos de infertilidade primária, dose de gonadotrofinas, dias de estimulação e FSH basal da mulher não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (tabela 1).

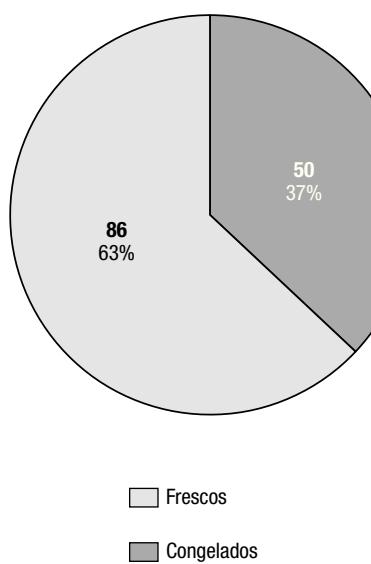


Figura 1. Número de ciclos ICSI-TESE realizados com espermatozoides colhidos a fresco e previamente criopreservados.

No grupo I colheu-se um número significativo superior de ovócitos ($9,2 \pm 5,5$ *versus* $10,3 \pm 5,4$; $p < 0,001$), tendo sido, concomitantemente, inseminado um maior número de ovócitos ($6,6 \pm 3,9$ *versus* $8,0 \pm 4,4$; $p < 0,001$). A análise da taxa de fertilização normal (50,2% *versus* 49,0%), taxa de implantação (14,7%

versus 19,3%) e taxa de gravidez clínica por transferência (25,7% *versus* 27,3%) não traduziu diferenças com significado estatístico entre os grupos I e II, respectivamente. Foram transferidos em média $1,7 \pm 0,9$ embriões no grupo I e $1,8 \pm 1,1$ embriões no grupo II (não significativo, NS).

Um pequeno subgrupo de 24 casais (67 ciclos) realizou ICSI-TESE tanto com espermatozoides frescos (grupo I', $n = 27$) como criopreservados (grupo II', $n = 40$). A idade da mulher, idade do homem, anos de infertilidade, dose de gonadotrofinas, dias de estimulação e FSH basal foi similar entre os dois grupos (tabela 2).

Apesar de ter sido colhido um número significativamente inferior de ovócitos no grupo I' ($8,4 \pm 4,1$ *versus* $9,8 \pm 5,1$; $p < 0,001$), assim como de ovócitos inseminados ($6,3 \pm 3,3$ *versus* $7,7 \pm 4,5$; $p < 0,001$), a taxa de fertilização não traduziu diferença com significado estatístico (57,9% *versus* 51,0%, respectivamente no grupos I' e II').

No entanto a taxa de implantação (2,2% *versus* 16,7%), taxa de gravidez clínica por transferência (3,9% *versus* 23,5%) e taxa de gravidez clínica por casal (4,2% *versus* 33,3%) foi significativamente inferior no grupo I' quando comparado com os dados do grupo II', respectivamente.

Não foram encontradas dificuldades técnicas nem complicações pós-operatórias, que pudessem perturbar a função testicular.

TABELA 1. Dados dos ciclos ICSI-TESE usando espermatozoides colhidos a fresco (grupo I) e previamente criopreservados (grupo II)

	Total (n = 136)	Grupo I (n = 86)	Grupo II (n = 50)
Idade mulher (anos) ^a	$31,3 \pm 3,4$	$30,7 \pm 3,5$	$32,2 \pm 2,9$
Idade homem (anos) ^a	$34,7 \pm 5,3$	$34,2 \pm 5,4$	$35,6 \pm 4,9$
Duração infertilidade primária (anos) ^a	$5,8 \pm 3,5$	$5,7 \pm 3,7$	$5,8 \pm 3,1$
FSH basal (mUI/ml) ^a	$6,3 \pm 2,4$	$6,1 \pm 2,3$	$6,7 \pm 2,4$
Dose gonadotrofinas (IU) ^a	$2094,3 \pm 798,6$	$2017,0 \pm 763,4$	$2223,5 \pm 838,5$
Duração estimulação (dias) ^a	$12,5 \pm 2,3$	$12,6 \pm 2,4$	$12,3 \pm 2,0$
N.º ovócitos colhidos/ciclo ^a	$9,6 \pm 5,5$	$9,2 \pm 5,5$	$10,3 \pm 5,4^b$
N.º ovócitos inseminados/ciclo ^a	$7,1 \pm 4,2$	$6,6 \pm 3,9$	$8,0 \pm 4,4^b$
Taxa fertilização normal (%)	49,7	50,2	49,0
N.º embriões transferidos/ciclo ^a	$1,7 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,9$	$1,8 \pm 1,1$
Taxa implantação (%)	16,5	14,7	19,3
Taxa gravidez clínica/ciclo (%)	22,8	22,1	24,0
Taxa gravidez clínica/TE (%)	26,3	25,7	27,3
Taxa gravidez clínica/casal (%)	38,3	25,7	38,7

^aDados em média \pm SD.

^b $p < 0,001$.

TABELA 2. Dados dos ciclos ICSI-TESE usando espermatozoides colhidos a fresco (grupo I') e previamente criopreservados (grupo II') no mesmo grupo de pacientes

	Total (n = 67)	Grupo I' (n = 27)	Grupo II' (n = 40)
Idade mulher (anos) ^a	31,6 ± 2,7	31,0 ± 2,8	32,1 ± 2,7
Idade homem (anos) ^a	35,5 ± 4,7	34,9 ± 4,8	36,0 ± 4,6
Duração infertilidade primária (anos) ^a	6,1 ± 3,2	6,0 ± 3,4	6,2 ± 3,1
FSH basal (mUI/ml) ^a	6,9 ± 2,5	7,0 ± 2,3	6,9 ± 2,6
Dose gonadotrofinas (IU) ^a	2224,0 ± 791,8	2073,1 ± 667,3	2324,7 ± 850,2
Duração estimulação (dias) ^a	12,3 ± 2,5	12,8 ± 2,4	12,0 ± 2,0
N.º ovócitos colhidos/ciclo ^a	9,2 ± 4,8	8,4 ± 4,1	9,8 ± 5,1 ^b
N.º ovócitos inseminados/ciclo ^a	7,1 ± 4,0	6,3 ± 3,3	7,7 ± 4,5 ^b
Taxa fertilização normal (%)	53,5	57,9	51,0
N.º embriões transferidos/ciclo ^a	1,7 ± 0,9	1,7 ± 0,7	1,7 ± 1,0
Taxa implantação (%)	10,7	2,2	16,7 ^c
Taxa gravidez clínica por ciclo (%)	13,4	3,7	20,0
Taxa gravidez clínica por TE (%)	15,0	3,9	23,5 ^d
Taxa gravidez clínica por casal (%)	37,5	4,2	33,3 ^e

^aDados em média ± SD.^bp < 0,001.^cp < 0,025.^dp < 0,05.^ep < 0,001.

CONCLUSÕES

Os nossos resultados mostram que os espermatozoides testiculares usados a fresco ou após criopreservação em homens azoospérmicos têm o mesmo potencial de fertilização. Isto sugere que os espermatozoides do testículo podem ser criopreservados e usados com sucesso em ciclos subsequentes, uma vez que a taxa de implantação e gravidez clínica não foram significativamente afectadas pela criopreservação.

Em algumas amostras, após a descongelação, a mobilidade dos espermatozoides foi nula. No entanto, após 1-2 horas de cultura a 37 °C, observaram-se espermatozoides móveis suficientes para permitir a microinjecção de todos os ovócitos maduros, ainda que, por vezes, houvesse a necessidade de descongelar um tubo/palheta adicional, o que está de acordo com Balaban et al³⁴ e Sousa et al²¹.

Os resultados do subgrupo de pacientes que realizaram ciclos com espermatozoides a fresco e criopreservados são semelhantes a estudos anteriores que apresentam resultados de gravidez semelhantes^{11,25-27}. Os melhores resultados no grupo dos espermatozoides previamente criopreservados pode ser explicado pela experiência que se adquiriu nos ciclos iniciais, levando a uma optimização dos protocolos de estimulação, e assim, aumentando o número de ovócitos maduros e,

por conseguinte, a taxa de fertilização. Isto pode ser apoiado pelo facto da dose de gonadotrofinas ser superior nos grupos II e II'. Este resultado é semelhante ao obtido por Wood et al³⁵, que encontrou melhores resultados quando se usavam espermatozoides criopreservados do epidídimos, em detrimento dos espermatozoides a fresco, em homens com AO. Neste subgrupo de pacientes, os dados mostraram que a taxa de fertilização, implantação e gravidez clínica por transferência não foram afectados pela criopreservação.

Em suma, os nossos resultados confirmam as conclusões prévias de Oates et al²⁵ e Gianaroli et al¹⁷, e sugerem que a criopreservação de espermatozoides colhidos por TESE é uma técnica que permite a obtenção de taxas de implantação e gravidez clínica por transferência razoáveis e até superiores às obtidas com espermatozoides colhidos a fresco.

A criopreservação surge assim como uma possibilidade viável, que permite: *a*) minimizar o risco de não haver espermatozoides disponíveis na altura da PF; *b*) evitar a repetição da biópsia e seus efeitos colaterais, e *c*) programar o ciclo de acordo com a conveniência da unidade e do casal. Ao mesmo tempo, transmite uma sensação de segurança aos casais ao saber que dispõem de uma nova oportunidade de colher espermatozoides a fresco, se for necessário.

Nogueira et al.³⁶ observaram por microscopia eletrônica de transmissão fenômenos de enrolamento e ruptura da membrana plasmática e do acrosoma em amostras de testículo após descongelamento, enquanto Steele et al.³⁷ não foram capazes de detectar qualquer diferença na percentagem de danos de DNA entre espermatozoides testiculares colhidos a fresco e previamente criopreservados. Estes dados devem ser tidos em consideração na altura de informar os casais sobre os resultados da técnica ICSI-TESE. No futuro esperamos recolher e correlacionar estes resultados com a taxa de abortamento.

Bibliografia

1. Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet*. 1992;340:17-8.
2. Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization rates and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1993;8:1061-6.
3. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Jassenswillen C, Staessen C, Verheyen G, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13 Suppl 1:134-42.
4. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1995;10:1457-60.
5. Nagy Z, Silber S, Liu J, Devroey P, Cecile J, Van Steirteghem A. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*. 1995;10:1123-9.
6. Kahraman S, Özgür S, Alatas C, Aksoy S, Tasdemir M, Nuhoglu A, et al. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod*. 1996;11:756-60.
7. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijls M, Segal-Bertin C, Geerts L, Van de Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in-vitro fertilization programme [letter]. *Hum Reprod*. 1993;8:1339-40.
8. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
9. Silber S, Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicular biopsy. *Hum Reprod*. 1995;10:148-52.
10. Devroey P, Nagy P, Tournaye H, Liu J, Silber S, Van Steirteghem A. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1996;11:1015-8.
11. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod*. 1997;12:1688-92.
12. Devroey P, Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Joris H, et al. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*. 1995;10:903-6.
13. Nagy Z, Silber S, Liu J, Devroey P, Cecile J, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1995;63:808-15.
14. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Rubio C, De los Santos MJ, Remohi J, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996;11:1309-13.
15. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia - a comparative study. *Fertil Steril*. 1997;68:892-7.
16. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El R. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia - a comparative study. *Hum Reprod*. 1998;13:1872-7.
17. Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, Colpi G, Belgrano E, Trombetta C, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. *Hum Reprod*. 1999;14:1034-8.
18. Tournaye H, Merdad T, Silber S, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*. 1999;14:90-5.
19. Habermann H, Seo R, Cielak J, Niederberger N, Prins GS, Ross R. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 2000;73:955-60.
20. Küpker W, Al-Hasani S, Johannisson R, Sandmann J, Ludwig M, Jocham D, et al. The use of cryopreserved mature and immature testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: risks and limitations. *Semin Reprod Med*. 2002;20:25-35.
21. Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira da Silva J, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod*. 2002;17:1800-10.
22. Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkeweld R, Van der Merwe JP. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19:53-9.
23. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW. The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod*. 2004;19:579-85.
24. Fumero Arteaga S, Figueroa Sosa V, Báez Quintana D, Blanes Zamora R, Vaca Sánchez R, Alberto Bethencourt J, et al. Nuestros resultados en ICSI con espermatozoides congelados y frescos obtenidos por TESE. *Rev Int Androl*. 2006;4:3-8.
25. Oates RD, Lobel SM, Harris DH, Pang S, Burgess CM, Carson DS. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996;11:133-8.
26. Ben-Yosef D, Yogeve L, Hauser R, Yavetz Y, Azem F, Yovel I, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1999;14:1794-801.
27. Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens CA, Ryan IP, Schriock ED, et al. A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. *Hum Reprod*. 2001;16:495-9.
28. Verheyen G, Vernaevé V, Van Landuyt L, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem A. Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod*. 2004;19:2822-30.
29. De Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular sperm. *Hum Reprod*. 1998;13:1893-7.
30. Wood S, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, Kingsland C, Lewis-Jones I. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fertil Steril*. 2002;77:1162-6.
31. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zaninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod*. 1999;14:741-8.
32. Christodoulou K, Jerkovic S, Geyer J, Allen L, Tindall L, Mantoudis E, et al. The effect of TESA cryopreservation on the outcome of ICSI cycles. BFS/ACE abstracts. *Hum Fertil*. 2002;5:86.
33. Amer M, El Haggar S, Moustafa T, El-Naser T, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum Reprod*. 1999;14:3030-4.
34. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm

- extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999;14:2808-11.
35. Wood S, Sephton V, Searle T, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, et al. Effect on clinical outcome of the interval between collection of epididymal and testicular spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *J Androl.* 2003;24:67-72.
36. Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem A. Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod.* 1999;14:2041-9.
37. Steele E, McClure N, Lewis SEM. Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertil Steril.* 2000;74:450-3.