

# Resultados da ICSI-TESE em azoospermia: influência da etiologia e criopreservação

Ilda Pires<sup>a,c</sup>, Helena Figueiredo<sup>a</sup>, Luís Ferraz<sup>b</sup>, Sueli Pinelo<sup>a</sup>, Helena Serra<sup>a</sup>, António Barbosa<sup>a</sup>, Eduarda Felgueira<sup>a</sup> y Angelina Tavares<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE. Vila Nova de Gaia. Portugal.

<sup>b</sup>Serviço de Urologia. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE. Vila Nova de Gaia. Portugal.

<sup>c</sup>Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE. Unidade II. Vila Nova de Gaia. Portugal.

## RESUMO

**Introdução:** A azoospermia pode ter uma etiologia de causa obstrutiva (AO) ou não-obstrutiva (ANO). Apesar de ser possível colher espermatozoides do testículo em ambos os casos para tratar um factor masculino de infertilidade, não está bem estabelecido se são comparáveis as taxas de sucesso após injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Vários factores podem influenciar o sucesso da ICSI em pacientes com azoospermia: etiologia, origem (epidídimo ou testículo) e *status* dos espermatozoides (frescos ou previamente criopreservados), entre outros.

**Material e métodos:** Foi efectuada uma análise retrospectiva das taxas de fecundação, gravidez e implantação envolvendo 136 ciclos ICSI com espermatozoides móveis colhidos do testículo em 81 casais com factor masculino isolado (azoospermia). A primeira parte deste estudo analisou o efeito da etiologia da azoospermia, comparando o sucesso da ICSI-TESE em 99 ciclos de AO e 37 ciclos de ANO. A segunda parte focou-se no efeito da criopreservação dos espermatozoides analisando o sucesso de 86 ciclos realizados com espermatozoides frescos e 50 ciclos realizados com espermatozoides testiculares previamente criopreservados.

**Resultados:** *Parte I:* os resultados da fecundação, implantação e gravidez foram inferiores nos casos de ANO, mas sem significado estatístico. *Parte II:* nos casos de AO os nossos dados demonstraram resultados semelhantes com espermatozoides frescos ou previamente criopreservados. O uso de espermatozoides testiculares previamente criopreservados demonstrou taxas de fecundação, implantação e gravidez inferiores nos casos de ANO.

**Conclusões:** A realização de ciclos ICSI-TESE em homens com AO tem melhor prognóstico do que em homens com ANO. O uso de espermatozoides testiculares previamente criopreservados não afecta o sucesso da ICSI tanto em homens com AO como ANO. O uso destes dados para decisões clínicas necessita de ser suportado por meta-análise de vários estudos.

**Palavras-chave:** Azoospermia obstrutiva. Azoospermia não-obstrutiva. Criopreservação. ICSI. Biópsia testicular extractiva.

## ABSTRACT

**ICSI-TESE outcomes in azoospermia: influence of aetiology and criopreservation**

**Introduction:** Azoospermia can have an obstructive (AO) or non-obstructive (ANO) aetiology. Although in both cases testicular sperm can be used to treat male infertility, it is not well established whether success rates following intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) are comparable. Various factors may influence the outcome of ICSI in azoospermic patients: aetiology, origin (epididymis or testicle) and sperm *status* (fresh or freeze-thawed), among others.

**Materials and methods:** A retrospective analysis of fertilization, pregnancy and embryo implantation rates was performed following 136 ICSI cycles with motile testicular sperm in 81 couples with male factor only (azoospermia). The first part of the study analysed the effect of the azoospermia aetiology, comparing the outcome of 99 AO and 37 ANO cycles of ICSI-TESE. The second part focused on the effect of sperm cryopreservation by analyzing the outcome of 86 ICSI cycles realized with fresh and 50 cycles realized with freeze-thawed testicular sperm.

**Results:** *Part I:* fertilization, implantation and pregnancy outcome were lower using sperm from men with NOA, but this did not reach statistical significance. *Part II:* our data demonstrated similar outcome between the use of fresh or freeze-thawed testicular sperm in men with AO. The use of frozen-thawed testicular sperm did demonstrate a lower fertilization, implantation and pregnancy rates in men with ANO.

**Conclusions:** The realization of ICSI-TESE cycles in men with AO has better success prognosis than in men with ANO. The use of frozen-thawed testicular sperm does not affect ICSI outcome both in men with AO and ANO. The use of such data on which to base clinical decisions needs to be supported by meta-analyses of several reports.

**Key words:** Azoospermia obstructive. Non-obstructive azoospermia. Cryopreservation. ICSI. Testicular sperm extraction.

**Correspondência:** Dra. I. Pires.

Unidade de Medicina da Reprodução.

Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE. Unidade II.

Rua Dr. Francisco Sá Carneiro, 4400-129 Vila Nova de Gaia. Portugal.

Correio electrónico: impires@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A azoospermia representa cerca de 10% dos casos de infertilidade masculina<sup>1</sup>. A azoospermia obstrutiva (AO) é caracterizada pela oclusão ou ausência de partes do tracto reprodutivo, impedindo que as células espermáticas entrem no plasma seminal antes da ejaculação. A azoospermia não obstrutiva (ANO) é causada por uma falha na produção de espermatozóides, de tal modo que o ejaculado não contém espermatozóides.

Inicialmente, nos casos de AO irreparável ou ausência bilateral congénita dos canais deferentes (ABCD) realizava-se a fecundação *in vitro* com espermatozóides aspirados do epidídimo<sup>2-4</sup>, mas os resultados eram desanimadores e imprevisíveis. Desde a introdução da microinjecção intracitoplasmática (ICSI) com espermatozóides do epidídimo<sup>5</sup> ou do testículo<sup>6-8</sup>, esta técnica tornou-se um procedimento de rotina na AO. Tem sido reportada taxas de fecundação, implantação e gravidez elevadas<sup>1,9-16</sup>, assim como uma taxa de obtenção de espermatozóides em quase 100% dos casos de AO<sup>17</sup>.

A realização de ciclos ICSI com espermatozóides colhidos do testículo é igualmente o método de eleição para o tratamento de infertilidade masculina por ANO<sup>18</sup>, remontando os primeiros nascimentos à década de 90<sup>19</sup>. Na população de pacientes com ANO a probabilidade de se encontrarem espermatozóides é de 48-68% num grupo de pacientes não seleccionados<sup>17,20-22</sup>, sugerindo focos de espermatogénese.

Pode ser antecipado que nos casos de ANO, tanto a quantidade como a qualidade dos espermatozóides recolhidos seja inferior à dos casos de AO. Os dados da literatura não são concordantes e há estudos que mostraram uma redução significativa nas taxas de fecundação e gravidez na ANO<sup>15,16,23</sup>; estudos que mostraram uma diminuição na taxa de fecundação, mas não na taxa de gravidez<sup>1,14</sup>; e outros que obtiveram taxas de fecundação e gravidez aceitáveis<sup>9,10,13,21,24-29</sup>.

A criopreservação de amostras de tecido testicular oferece a possibilidade de se evitar a repetição de colheitas cirúrgicas, contornando as alterações da vascularização, calcificações e outros danos possivelmente permanentes no testículo<sup>30,31</sup>, e torna-se particularmente importante nos casos de testículos reduzidos, onde biopsias múltiplas podem representar uma perda significativa de massa testicular.

Foram reportados resultados comparáveis em termos de fecundação, qualidade embrionária, taxas de implantação e de gravidez usando espermatozóides do testículo frescos e descongelados para pacientes com AO<sup>25,29,32-38</sup>. Os primeiros casos de relatos de uso de espermatozóides testiculares congelados e posteriormente descongelados em homens com ANO eram casos

clínicos<sup>39,40</sup> ou estavam incluídos em grupos mistos de uma maioria de AO e alguns ANO<sup>25,28,41-43</sup>. Um problema adicional destes primeiros relatos era a definição de falha testicular, que não estava muitas vezes claramente definida e/ou nem sempre baseada na histologia testicular. Mesmo assim, têm sido descritos resultados aceitáveis de ICSI com espermatozóides testiculares descongelados em pacientes com ANO<sup>27,33,44-47</sup>.

Ao contrário da AO onde podem ser facilmente usados espermatozóides viáveis das amostras descongeladas, a pior qualidade do tecido testicular na ANO não permite a criopreservação e posterior ICSI em todos os casos. Como tem sido demonstrado para os espermatozóides do ejaculado, também ocorre uma diminuição significativa na mobilidade e vitalidade dos espermatozóides do testículo, após descongelação<sup>48</sup>. Isto implica que casos com um número extremamente baixo de espermatozóides recolhidos possam não ser candidatos à criopreservação. A biópsia diagnóstica prévia com criopreservação pode ser considerada uma opção controversa para estes casos. Há de facto uma elevada probabilidade de não se encontrarem espermatozóides na biópsia diagnóstica devido à sua ausência total ou à recolha limitada de tecido e/ou esforços de procura. De modo a contornar o risco do material descongelado ser inadequado para a ICSI após descongelação, alguns centros definem limites de qualidade para a criopreservação de espermatozóides testiculares e noutros os casais apenas entram em ciclo se tiverem qualidade (motilidade) suficiente numa fracção testicular previamente descongelada. Neste sentido, a população de ANO pode diferir grandemente entre centros, o que pode justificar os diferentes resultados publicados.

Na nossa unidade, historicamente, a opção de eleição para os casais com ANO era o uso de espermatozóides do testículo colhidos a fresco, mas actualmente também é oferecida a possibilidade de se realizar biópsia diagnóstica seguida de criopreservação. Os casais são cuidadosamente esclarecidos sobre os prós e contras de ambas as estratégias.

O objectivo deste estudo retrospectivo foi analisar a eficiência do uso de espermatozóides testiculares mediante a etiologia da azoospermia e o efeito da criopreservação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População em estudo

Este estudo retrospectivo incluiu 136 ciclos de ICSI realizados em 81 casais com factor masculino isolado (azoospermia) com espermatozóides colhidos do tes-

tículo por biópsia extractiva (TESE). A azoospermia foi confirmada em pelo menos duas amostras de espermatozoides após centrifugação a 1800g e exploração de todo o pellet.

A etiologia da azoospermia foi classificada pela equipa de Andrologia como AO em 99 ciclos (59 casais) e ANO em 37 ciclos (22 casais) (tabela 1), com base na história clínica, exame físico, doseamento hormonal (FSH, LH e testosterona), análises histológicas, ultra-sonografia, análises repetidas ao sêmen e dados cirúrgicos. Sempre que indicado foi realizada ecografia transrectal, análise do cariótipo, pesquisa de microdelecções no braço longo do cromossoma Y e análise das mutações mais frequentes do gene da fibrose cística.

A etiologia da AO incluiu 1 ciclo de ejaculação retrógrada, 6 de processo inflamatório/infeccioso, 44 de ausência bilateral de canais deferentes, 11 de bloqueio tubular, 6 após trauma, 9 de anejaculação e 22 de causa desconhecida, enquanto que a etiologia da ANO incluiu 6 casos de paragem de maturação completa, 3 de hipoplasia e/ou hipoespermatogénese, 3 de síndrome células de Sertoli, 6 após radioterapia, 9 de cariótipo anormal e 10 de causa desconhecida (tabela 2).

Oitenta e seis ciclos foram realizados com espermatozoides frescos (58 ciclos de AO e 28 ciclos de ANO), enquanto que os restantes 50 ciclos foram realizados com espermatozoides previamente criopreservados (41 ciclos de AO e 9 ciclos de ANO).

Sempre que houve necessidade de repetir a biópsia no mesmo testículo, houve pelo menos um tempo mínimo de espera de seis meses, conforme defendido por Amer et al<sup>49</sup>, de modo a evitar danos intratesticulares permanentes e obter colheita positiva.

Todos os casais foram aconselhados sobre os procedimentos e deram consentimento informado para os seus tratamentos.

### Estimulação ovárica e punção folicular (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 18mm, com uma concentração de estradiol de 200-300pg/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.

**TABELA 1. Características da população em estudo**

	<b>AO (n = 99)</b>	<b>ANO (n = 37)</b>	<b>Total (n = 136)</b>
Casais (%)	59 (73%)	22 (27%)	81 (100%)
Idade média ± SD mulher (anos)	31,4 ± 3,4	30,9 ± 3,1	31,3 ± 3,4
Idade média ± SD homem (anos)	35,4 ± 5,6	32,9 ± 3,9	34,1 ± 5,3
Duração média ± SD infertilidade primária (anos)	5,9 ± 3,7	5,5 ± 2,9	5,8 ± 3,5

**TABELA 2. Número de casais e ciclos efectuados de acordo com a etiologia da azoospermia**

	<b>Casais (n)</b>	<b>Ciclos (n)</b>
<b>AO (total)</b>	59	99
Ejaculação retrógrada	1	1
Infeccioso/inflamatório	2	6
ABCD	24	44
Bloqueio tubular	7	11
Trauma	4	6
Anejaculação	4	9
Desconhecida	17	22
<b>ANO (total)</b>	22	37
Paragem maturação	4	6
Hipoplasia e hipoespermatogénese	1	3
S. células Sertoli	1	3
Após radioterapia	2	6
Cariótipo anormal*	6	9
Desconhecida	8	10
<b>Total</b>	81	136

\*3 homens 47XXY, um 45XO,46XY e outro 45XY(t13;14).

### Biópsia testicular e ICSI

A polpa testicular foi colhida por TESE sob anestesia local conseguida com 5-6ml de mistura de 1:1 1% lidocaína (xilocaína 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 1cm 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 colhidos em diferentes áreas do mesmo testículo e/ou no contralateral até se encontrarem espermatozoides. No máximo foram colhidos 6 fragmentos do mesmo testículo.

A pesquisa de espermatozoides foi efectuada em microscópio invertido (Diaphot 330, Nikon) equipado

com ópticas de Hooffman e platina aquecida na ampliação de 200×. Em todos os casos foram encontrados espermatozóides móveis. A suspensão foi lavada com 1-2 ml de SPM® e incubada em tubo cónico a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Imediatamente antes da ICSI, o pellet foi centrifugado a 200 g durante 10 min, após o que foi ressuspensionado em 50-100 µl de SPM® e incubado a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, durante pelo menos 30 min. A identificação e imobilização dos espermatozóides foi realizada em microgotas sobre parafina líquida (Medicult).

A ICSI foi realizada mediante protocolo convencional<sup>50</sup>. Após a remoção das células do cumulus e corona, foi efectuada uma avaliação dos ovócitos de modo a serem apenas injectados os ovócitos em metafase II. A fecundação foi avaliada 16-18h após a ICSI e confirmada pela presença de dois pro-núcleos (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 (N<sub>2</sub>L) durante 30 min, antes de ser submergida e armazenada em N<sub>2</sub>L. A descongelação foi efectuada colocando o tubo/palhetas sobre água corrente durante 5 min 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 os dias 2-5 após PF, consoante o número/qualidade dos embriões, idade da mulher e o número de ciclos anteriores. Foi administrada progesterona intravaginal para suporte luteínico (3 × 200 mg/dia; Utrogestan®, Jaba) a partir do dia da PF até à 12.<sup>a</sup> semana de gestação, se gravidez positiva.

A detecção da gravidez foi efectuada por doseamento de β-hCG plasmática ao 16.<sup>o</sup> dia após PF. A gravidez clínica foi confirmada pela observação de saco gestacional à 6.<sup>a</sup> 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<sup>2</sup>, sempre que apropriado. As diferenças foram consideradas significativas para p < 0,05.

**TABELA 3. Resultados dos ciclos ICSI-TESE mediante a etiologia da azoospermia**

	<b>AO (n = 99)</b>	<b>ANO (n = 37)</b>
Dose média ± SD gonadotrofinas (IU)	1.980,5 ± 787,5	2.394,4 ± 748,3
Duração média ± SD estimulação (dias)	12,3 ± 2,2	13,0 ± 2,4
N.º médio ± SD ovócitos colhidos/ciclo	9,6 ± 5,0	9,4 ± 6,6
N.º médio ± SD ovócitos inseminados/ciclo	7,5 ± 4,1	5,9 ± 4,2 <sup>a</sup>
N.º médio ± SD ovócitos fecundados/ciclo	3,9 ± 2,6	2,8 ± 2,3 <sup>b</sup>
Taxa fecundação (%)	51,5	43,4
N.º médio ± SD embriões transferidos/ciclo	1,7 ± 1,0	1,7 ± 0,9
Taxa implantação (%)	18,7	10,0
Taxa gravidez clínica/ciclo (%)	26,3	13,5
Taxa gravidez clínica/transferência (%)	29,9	16,1
Taxa gravidez clínica/casal (%)	44,1	22,7

<sup>a</sup>p < 0,001.

<sup>b</sup>p < 0,05.

## RESULTADOS

Em todos os ciclos foi encontrado um número suficiente de espermatozóides móveis para injectar todos os ovócitos maduros.

### Etiologia da azoospermia

No total foram realizados 99 ciclos de ICSI-TESE de AO e 37 ciclos de ANO (tabela 3). A dose de gonadotrofinas e dias de estimulação não foi significativamente diferente entre os dois grupos (tabela 3). Apesar de ter sido colhido um número semelhante de ovócitos (9,6 ± 5,0 *versus* 9,4 ± 6,6), o número de ovócitos inseminados e fecundados foi significativamente superior na AO (7,5 ± 4,1 *versus* 5,9 ± 4,2 e 3,9 ± 2,6 *versus* 2,8 ± 2,3) do que na ANO (p < 0,001). A taxa de fecundação normal (51,5% *versus* 43,4%), foi significativamente superior na AO (p < 0,05). O número de ovócitos transferidos foi semelhante (1,7 ± 1,0 *versus* 1,7 ± 0,9) entre os dois grupos, mas as taxas de implantação (18,7% *versus* 10,0%) e gravidez clínica por transferência (29,9% *versus* 16,1%) foram superiores na AO, embora sem significado estatístico.

### Efeito da criopreservação

O sucesso da ICSI usando espermatozóides testiculares colhidos a fresco ou previamente criopreservados nos casos de AO foi comparado e é apresentado na

tabela 4. O número de ovócitos colhidos e inseminados foi significativamente inferior no grupo dos ciclos realizados com espermatozóides colhidos a fresco ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). No entanto, a taxa de fecundação foi semelhante nos ciclos realizados com espermatozóides colhidos a fresco e descongelados (52,3% e 50,6%, respectivamente). A taxa de implantação e gravidez clínica foi superior com espermatozóides descongelados, embora sem significado estatístico.

No grupo da ANO o efeito da criopreservação dos espermatozóides testiculares não se fez sentir na taxa de fecundação, implantação ou gravidez clínica (tabela 5), uma vez que apesar dos resultados terem sido melhores no grupo dos espermatozóides colhidos a fresco, tal diferença não se traduziu em significado estatístico.

## DISCUSSÃO

Vários factores influenciam o sucesso da ICSI em pacientes com azoospermia, tais como a idade dos parceiros, a histologia testicular, origem dos espermatozóides, etiologia da azoospermia, assim como o facto dos espermatozóides serem frescos ou descongelados. Parâmetros associados à mulher também têm um contributo significativo, tais como a idade e reserva ovárica.

A etiologia da azoospermia subjacente pode influenciar a viabilidade dos espermatozóides testiculares colhidos tal como, na maioria dos casos é determinante, a sua fonte, (epidídimo ou testículo), uma vez que se correlaciona com o seu *status* de maturação. A viabilidade dos espermatozóides, avaliada pela motilidade, pode ser influenciada pela sua fonte. Uma comparação do sucesso de ciclos ICSI realizados num mesmo laboratório pode contribuir para esclarecer este tópico. No nosso estudo as taxas de fecundação, implantação e gravidez clínica por ciclo, foram superiores no grupo de pacientes com AO.

Uma razão plausível para a pior taxa de fecundação após ICSI nos casos de ANO pode ser a baixa concentração de espermatozóide que normalmente é possível recuperar nestas situações e que reduz a possibilidade de escolha de espermatozóides “normais e maduros” para microinjectar. Lewin et al<sup>51</sup> estabeleceu uma correlação clara entre o número de espermatozóides colhidos e a taxa de fecundação em casos de ANO. Por outro lado, a taxa de fecundação é afectada pelo grau de comprometimento da espermatogénese no grupo da ANO. Nos casos de defeitos graves na espermatogénese (síndrome de só células de Sertoli, hipoespermatogénese ou paragem da maturação), por vezes

**TABELA 4. Resultados dos ciclos ICSI-TESE mediante efeito da criopreservação na AO**

AO	Frescos (n = 58)	Descongelados (n = 41)
Dose média ± SD		
gonadotrofinas (IU)	1.889,9 ± 739,3	2.105,1 ± 833,4
Duração média ± SD		
estimulação (dias)	12,4 ± 2,3	12,1 ± 1,9
N.º médio ± SD ovócitos colhidos/ciclo	9,4 ± 4,5	10,5 ± 5,4 <sup>a</sup>
N.º médio ± SD ovócitos inseminados/ciclo	7,2 ± 3,8	8,0 ± 4,5 <sup>b</sup>
N.º médio ± SD ovócitos fecundados/ciclo	3,8 ± 2,5	4,1 ± 2,7
Taxa fecundação (%)	52,3	50,6
N.º médio ± SD embriões transferidos/ciclo	1,7 ± 0,9	1,8 ± 1,1
Taxa implantação (%)	16,2	22,2
Taxa gravidez clínica/ciclo (%)	25,9	26,8
Taxa gravidez clínica/transferência (%)	29,4	44,0
Taxa gravidez clínica/casal (%)	28,3	30,6

<sup>a</sup>p < 0,001.

<sup>b</sup>p < 0,01.

**TABELA 5. Resultados dos ciclos ICSI-TESE mediante efeito da criopreservação na ANO**

ANO	Frescos (n = 28)	Descongelados (n = 9)
Dose média ± SD		
gonadotrofinas (IU)	2.275,9 ± 746,1	2.750,0 ± 633,4
Duração média ± SD		
estimulação (dias)	13,1 ± 2,7	12,8 ± 1,4
N.º médio ± SD ovócitos colhidos/ciclo	9,4 ± 7,0	9,2 ± 5,2
N.º médio ± SD ovócitos inseminados/ciclo	5,3 ± 3,9	7,8 ± 4,6*
N.º médio ± SD ovócitos fecundados/ciclo	2,6 ± 2,2	3,2 ± 2,6
Taxa fecundação (%)	44,3	41,4
N.º médio ± SD embriões transferidos/ciclo	1,7 ± 0,8	1,8 ± 0,9
Taxa implantação (%)	11,4	6,3
Taxa gravidez clínica/ciclo (%)	14,3	11,1
Taxa gravidez clínica/transferência (%)	17,4	12,5
Taxa gravidez clínica/casal (%)	19,1	16,7

\*p < 0,001.

estão disponíveis para a ICSI espermatozóides não completamente maduros, o que pode explicar a taxa de fecundação inferior nestes casos. No nosso estudo, devido ao reduzido número de casos de ANO, não se efectuou a análise pelas diferentes categorias de ANO.

O Task Force ESHRE da ICSI reporta a sua experiência no ano de 1995<sup>52</sup> e refere a tendência para uma redução na taxa fecundação após ICSI em pacientes com ANO relativamente a pacientes com AO.

Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de gravidez, taxa de nascimento e dados perinatais entre os dois grupos.

Nos casos de AO é possível colher espermatozóides na maioria dos casos, no entanto, nos casos de ANO não é possível prever com certeza o sucesso da colheita de espermatozóides maduros, uma vez que não há bons indicadores disponíveis, incluindo a idade, nível de FSH ou histopatologia testicular prévia<sup>17,53</sup>. O nível plasmático da inibina B, como indicador da função das células de Sertoli pode correlacionar-se com a hipótese de encontrar espermatozóides nos casos de ANO, sendo esta significativamente superior nos casos de sucesso<sup>54,55</sup>. No entanto, um estudo de Von Eckardstein et al<sup>56</sup> não encontrou esta correlação e outro de Vernaev et al<sup>57</sup> conclui que a inibina B falhou a predição da presença de espermatozóides no testículo em 185 casos de ANO. Friedler et al<sup>36</sup> concluíram que a idade do paciente ou o nível de FSH plasmático falharam como indicadores da presença ou falha de espermatozóides no testículo após TESE. O indicador mais forte foi a histologia, e era mais forte nos casos de hipoespermatogénese severa, tal como noutros estudos<sup>17,22,58,59</sup>.

Friedler et al<sup>36</sup> sugerem que na ausência de parâmetros não invasivos que predigam a possibilidade de colheita de espermatozóides, a biópsia deve ser efectuada anteriormente à estimulação ovárica das mulheres, especialmente se o uso de espermatozóides dador não for uma opção de alternativa. De Croo et al<sup>1</sup> partilham a mesma opinião, pelo menos para os casos de ANO. Efectuar a biópsia previamente à PF evita a realização da estimulação ovárica nos casos onde não se encontrem espermatozóides. Simultaneamente quando a biópsia é realizada aquando da PF, é possível efectuar uma procura mais exaustiva do tecido testicular. Por outro lado, ao efectuar a biópsia previamente os poucos espermatozóides encontrados podem perder-se na criopreservação. Infelizmente não há indicadores seguros do sucesso da recolha de espermatozóides, excepto a histopatologia testicular<sup>17</sup>.

A criopreservação de espermatozóides após extracção testicular 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. A maioria dos estudos que comparam resultados usando espermatozóides provenientes do testículo a fresco e descongelados não faz distinção entre AO e ANO, ou seja, não comparam o efeito da criopreservação mediante a etiologia da azoospermia. Isto deve-se predominantemente ao baixo número de casos que seria analisado em cada grupo.

Apesar de nos casos de AO ser normalmente recolhido um maior número de espermatozóides móveis

do que nos casos de ANO, tanto nuns casos como noutros, normalmente a quantidade recolhida permite que se realize a criopreservação. Nos casos de ANO a criopreservação bem sucedida permite que se possa realizar biópsias dirigidas e não apenas diagnósticas.

São poucos os artigos que comparam os resultados de ANO usando espermatozóides a fresco e congelados<sup>27,36,44</sup> e estes não mostram diferença significativa nem na taxa de fecundação, nem na taxa de gravidez. Uma meta-análise dos resultados publicados poderia ajudar a tomar decisões clínicas mais eficazes<sup>29</sup>.

No nosso estudo, apesar de no grupo da AO, a taxa de fecundação obtida com espermatozóides descongelados ter sido inferior, a taxa de implantação e taxa de gravidez foram superiores, embora sem tradução estatística. Já na ANO foi possível obter melhores resultados utilizando espermatozóides colhidos a fresco.

Pode-se concluir que na perspectiva de obter melhores taxas de fecundação com espermatozóides colhidos a fresco nos casos de AO, a ICSI deve ser planeada em conjunto com a biópsia testicular diagnóstica. Pelo contrário, nos casos de ANO, como a taxa de recolha de espermatozóides é baixa, mas como os resultados usando espermatozóides colhidos a fresco ou previamente criopreservados não são significativamente diferentes, pode ser oferecida a biópsia electiva prévia à estimulação ovárica, especialmente quando a opção de recurso a gâmetas de dador não se põe na unidade. A principal vantagem desta política é evitar a estimulação ovárica nos casos onde não se encontrem espermatozóides para a ICSI. No entanto, em alguns homens apenas podem ser encontrados muito poucos espermatozóides para a criopreservação, e noutros os riscos de repetição da cirurgia (no caso de não sobreviverem espermatozóides após a descongelação) é inaceitável. Nestes casos a criopreservação selectiva do tecido testicular não se coaduna com os melhores interesses do paciente.

## Bibliografia

1. De Croo I, van der Elst J, Everaert K, de Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000;15:1383-8.
2. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization using sperm aspirated from the epididymis. *J In vitro Embryo Transfer.* 1985;2:112-22.
3. Silber S. Results of microsurgical vasoepididymostomy: role of epididymis in sperm maturation. *Hum Reprod.* 1989;4:298-303.
4. Silber S, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Asch RH. Congenital absence of the vas deferens: the fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Engl J Med.* 1990;323:1788-92.
5. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril.* 1994;61:1045-51.

6. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993;342:864.
7. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs 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. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, et al. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993;342:1237.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Fahmy I, Mansour R, Aboulghar M, Serour G, Kamal A, Tawab NA, et al. Intracytoplasmic sperm injection using surgically retrieved epididymal and testicular spermatozoa in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Int J Androl*. 1997;20:37-44.
16. Mansour RT, Kamal A, Fahmy I, Tawab N, Serour GI, Aboulghar MA. Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1997;12:1974-9.
17. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, et al. Are there any predictive factors for successful sperm recovery in azoospermic patients. *Hum Reprod*. 1997;12:80-6.
18. 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.
19. Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, et al. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1995;10 Suppl 1:115-9.
20. Kahraman S, Özgür S, Alatas C, Aksoy S, Balaban B, Evrenkaya T, et al. High implantation and pregnancy rates with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1996;11:673-6.
21. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menéndez S, Zaninovic N, Veeck LL, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology*. 1997;49:435-40.
22. Tournaye H, Liu J, Nagy Z, Carnus M, Goossens A, Silber S. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996;11:127-32.
23. Vernaev V, Bonduelle M, Tournaye H, Camus M, van Steirteghem A, Devroey P. Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2003;18:2093-7.
24. Madgar I, Hourvitz A, Levron J, Seidman D, Shulman A, Raviv G, et al. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 1998;69:1080-4.
25. 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.
26. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 2001;16:125-9.
27. 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.
28. Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkweld R, van der Merwe JP. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19:53-9.
29. 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.
30. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod*. 1997;12:1688-92.
31. Ron-El R, Strauss S, Friedler S, Strassburger D, Komarovsky D, Raziel A. Serial sonography and colour flow Doppler imaging following testicular and epididymal sperm extraction. *Hum Reprod*. 1998;13:3390-3.
32. Fischer R, Baukloh V, Naether OGJ, Schulze W, Salzbrunn A, Benson DM. Andrology: case report. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Hum Reprod*. 1996;11:2197-9.
33. Ben-Yosef D, Yorgev 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.
34. Prins GS, Dolgina R, Studney P, Kaplan B, Ross L, Niederberger C. Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive Azoospermia. *J Urol*. 1999;161:1504-8.
35. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;169:15-9.
36. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-El R. Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. *Hum Reprod*. 2002;17:3114-21.
37. 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.
38. Buffat C, Patrat C, Merlet F, Guibert J, Epelboin S, Thiounn N, et al. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction. *Hum Reprod*. 2006;21:1018-24.
39. Romero J, Remohi J, Mínguez Y, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 1996;65:877-9.
40. Perraguin-Jayot S, Audebert A, Empereire JC, Parneix I. Ongoing pregnancies after intracytoplasmic injection using cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12:2706-9.
41. Gil-Salom M, Romero J, Mínguez 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.
42. 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.
43. Huang FJ, Chang SY, Tsai MY, Kug FT, Lin YV, Wu JF, et al. Clinical implications of intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved testicular spermatozoa from men with azoospermia. *J Reprod Med*. 2000;45:310-6.
44. 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.
45. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunninham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1997;12:734-9.

46. Habermann H, Seo R, Cielsak 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.
47. 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.
48. Verheyen G, Joris H, Crits K, Nagy Z, Tournaye H, van Steirteghem A. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update*. 1997;3:195-203.
49. Amer M, El Haggag 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.
50. van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, et al. High fertilization rates and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1993;8:1061-6.
51. Lewin A, Reubinoff B, Porat-Katz A, Weiss D, Eisenberg V, Arbel R, et al. Testicular fine needle aspiration: the alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1999;14:1785-90.
52. Tarlatzis B, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from ESRHE ICSI Task Force. *Hum Reprod*. 1998;13 Suppl 1:165-73.
53. Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates RD. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non-obstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology*. 1997;49:91-6.
54. Ballesca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, de Osaba MJ. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2000;15:1734-8.
55. Brugo-Olmedo S, de Vincentiis S, Calamera JC, Urruti F, Noddar F, Acosta AA. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2001;76:1124-9.
56. von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2496-501.
57. Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, van Steirteghem A, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2002;17:971-6.
58. Mercan R, Urman B, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A, Isiklar A, et al. Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy. *Hum Reprod*. 2000;15:1548-51.
59. Vicari E, Grazioso C, Burrello N, Cannizzaro M, D'Agata R, Calogero AE. Epididymal and testicular sperm retrieval in azoospermic patients and the outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the etiology of azoospermia. *Fertil Steril*. 2001;75:215-6.