

## **Eficacia de los espermatozoides criopreservados de origen epididimario y testicular para ICSI**

### *Efficacy of cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa for ICSI*

Quintero LA, López-Baeza F, Monzó A, Navarro I, Jiménez-Moreno V, Naranjo F, Santana AG, Montañana V, Romeu A.

Instituto de Medicina Reproductiva (IMER). Valencia. España.

#### **Resumen**

*Objetivo:* Valorar los resultados obtenidos tras microinyección espermática con espermatozoides criopreservados de origen testicular y epididimarios.

*Ambito:* Centro privado de diagnóstico y tratamiento de la esterilidad.

*Sujetos del estudio:* Han sido estudiados 23 ciclos de estimulación ovárica para ICSI con espermatozoides criopreservados, 11 de origen epididimario y 12 de origen testicular.

*Intervenciones:* Obtención de espermatozoides por punción-aspiración epididimaria y biopsia testicular. Hiperestimulación ovárica controlada. Microinyección espermática.

*Parámetros de valoración:* i) Porcentaje de fecundación; ii) tasa de implantación y iii) porcentaje de embarazo.

*Resultados:* El porcentaje total de fecundación por ovocito fue del 73,07%, obteniéndose una tasa de fecundación significativamente mayor con espermatozoides epididimarios (79,2%) que con espermatozoides testiculares (67,08%). El porcentaje de implantación por embrión fue del 18,9% cuando se utilizaron espermatozoides epididimarios y del 10,2% cuando los gametos utilizados fueron de origen testicular, diferencia estadísticamente significativa. Con respecto a la tasa de gestación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ciclos en que se utilizaron espermatozoides epididimarios y testiculares, siendo estas del 45,4% y 25% respectivamente.

---

Recibido: 2/05/2001

Aceptado: 27/05/2001

**Correspondencia:** Dr. Luis Alberto Quintero

Instituto de Medicina Reproductiva (IMER)

C/ Santísima Trinidad, 45

46110 Godella (Valencia) España

E. Mail: imer@arrakis.es

*Conclusiones: El uso de espermatozoides criopreservados de origen epididimario parece ser una alternativa eficaz en el manejo de la azoospermia obstructiva. Sin embargo, con respecto al uso de gametos criopreservados de origen testicular, es necesario la realización de estudios con series más amplias para poder sacar conclusiones definitivas al respecto.*

**Palabras clave:** Azoospermia. Microinyección espermática. Espermatozoides epididimarios. Espermatozoides testiculares. Criopreservación.

### **Summary**

*Objective: To evaluate the results obtained after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa.*

*Setting: Private unit of sterility diagnosis and treatment*

*Patients: The study include 23 ovarian stimulation cycles for intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved spermatozoa, in 11 cases were obtained by epididymal puncture and in 12 cases by testicular biopsy.*

*Interventions: Spermatozoa recovery by epididymal puncture and testicular biopsy. Controlled ovarian hyperstimulation. Intracytoplasmic sperm injection.*

*Main outcomes measures: i) Fertilization rate; ii) implantation rate & iii) pregnancy rate.*

*Results: The global fertilization rate was 73,07%. With cryopreserved epididymal spermatozoa the fertilization rate was 79,2% and with testicular gametes was 67,08%, this difference was significant. The implantation rate per transferred embryo was significantly lower in the testicular sperm group than in the epididymal sperm group (10,2% versus 18,9%  $p=0,04$ ). No statistically significant difference was noted in the pregnancy rate between the use of epididymal and testicular spermatozoa (45,4% versus 25%  $p=0,5$ ).*

*Conclusions: The use of cryopreserved epididymal spermatozoa was a good alternative in the management of obstructive azoospermia. However, for the extended use of frozen-thawed testicular spermatozoa is necessary more studies to obtain definitive conclusions*

**Key Words:** Azoospermia. Intracytoplasmic sperm injection. Epididymal spermatozoa. Testicular spermatozoa. Cryopreservation.

## **INTRODUCCIÓN**

La microinyección espermática (ICSI) utilizando espermatozoides de origen testicular y epididimarios ha demostrado ser es una alternativa eficaz para conseguir un embarazo en casos de azoospermia (1, 2).

Las indicaciones para la aspiración epididimaria de espermatozoides descritas por la IFFS en la reunión del Comité Ejecutivo realizada en Montpellier en 1995 y revisadas en el año 1998 (3) son las siguientes:

- Agenesia bilateral de conductos deferentes
- Fallo de vasoepididimostomia
- Fallo de vasovasostomia
- Síndrome de Young
- Azoospermia a consecuencia de herniorrafia bilateral
- Obstrucción de conductos eyaculadores
- Aneyaculación por lesión medular, diabetes, linfoadenectomía.

- Eyaculación retrógrada
  - Disfunción sexual
  - Dificultad para la masturbación durante una FIV
- Las indicaciones para la realización de una biopsia testicular para obtener espermatozoides son:
- Todas las indicaciones para la aspiración epididimaria
  - Tejido cicatrizal que imposibilita la aspiración epididimaria
  - Hipoespermatogénesis o hipoplasia de células germinales
  - Aplasia de células germinales con espermatogénesis focal (Sind. de células de Sertoli con espermatogénesis focal)
  - Necrozoospermia
- Estas técnicas plantean el inconveniente de que todavía no existen parámetros preoperatorios fiables que ofrezcan la garantía de obtener espermatozoides (4); ni siquiera haberlos obtenido en biopsias testiculares previas garantiza la recuperación de gametos en

procedimientos similares posteriores (5). Esto obliga a cuestionar si está justificada la estimulación ovárica de la mujer y la punción folicular, con los costes y riesgos inherentes que conllevan, sin tener la seguridad de obtener espermatozoides para la realización de la ICSI.

Aunque la recuperación de espermatozoides en pacientes con azoospermia obstructiva es prácticamente del 100% (9), en las no obstructivas varía según autores entre un 30 y un 70% (6, 7, 8, 29).

Una alternativa para la eventualidad de no recuperar espermatozoides sería el realizar las técnicas quirúrgicas para su obtención, previamente a la estimulación ovárica, criopreservando los gametos en caso de obtenerlos. Esta actitud además de asegurar la disponibilidad de espermatozoides para realizar la ICSI, ofrecería la ventaja de que con una sola intervención se podría congelar suficiente muestra para la realización de varios intentos de ICSI. Por otra parte disminuirían los inconvenientes asociados a la programación de la captación ovocitaria y recuperación de los espermatozoides de forma sincrónica.

Está descrito que la viabilidad de los espermatozoides tras congelación-descongelación es de 40-50% sin diferencias según su lugar de obtención, testículo o epidídimo. Esto ha sido probado comparando el número de espermatozoides móviles antes y después de descongelar, y también con pruebas de tinción vital y test hipoosmótico (HOS) (17).

En función de las ventajas que representaría el hecho de realizar los procedimientos quirúrgicos de obtención de espermatozoides y su criopreservación de forma previa a la estimulación ovárica de la mujer, el presente trabajo tiene como objetivo el valorar la eficacia de los espermatozoides de origen testicular y epididimarios criopreservados para ICSI.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos del estudio

Han sido estudiados 23 ciclos de punción ovárica para ICSI practicados a 15 parejas con diagnóstico de esterilidad primaria.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron: i) varón azoospermico, ii) mujer con función reproductora normal o factor tubárico, (no vinculado a endometriosis) excluyendo cualquier otra causa que justifique la esterilidad y iii) obtención y criopreservación de espermatozoides tras biopsia testicular o por aspiración epididimaria.

La media de edad de las mujeres fue de  $33,04 \pm 3,1$  (27-37), y la de los hombres de  $39,5 \pm 8,9$  (27-55) años.

El diagnóstico alcanzado tras el estudio en las mujeres fue de función reproductora normal en el 78,2% de los casos y de factor tubárico en el 21,8%.

Tras el estudio del varón, llevado a cabo siguiendo el protocolo diagnóstico de la azoospermia descrito por López-Baeza y cols (10), el diagnóstico fue de azoospermia obstructiva en el 65,2% (n=15) y secretora en el 34,8% (n=8). En el grupo de pacientes con diagnóstico de azoospermia obstructiva, el 80% (n=12) de los casos se trataba de una vasectomía, y en el 20% (n=3) de los casos se trataba de una agenesia de deferentes.

En los pacientes con azoospermia obstructiva no secundaria a vasectomía fueron investigadas las mutaciones asociadas a la fibrosis quística, en las secretoras se realizó un cariotipo en sangre periférica.

La media de los valores de FSH en los varones fue de  $4,8 \pm 2,7$  (2,1-12,4) mUI/ml, siendo de  $6,5 \pm 3,3$  en los casos con diagnóstico de azoospermia secretora y de  $3,9 \pm 1,9$  en los de obstructiva (p=0,02).

Del total de los ciclos, en 11 casos los espermatozoides se obtuvieron por aspiración epididimaria, y en los 12 restantes tras biopsia testicular. En ambos casos el procedimiento se realizó al menos un mes antes de la punción folicular de la mujer y el material obtenido fue criopreservado.

### Procedimientos para la obtención de los espermatozoides

En los casos de azoospermia secretora (n=8) se llevó a cabo una biopsia testicular (TESE) bajo anestesia local. Fueron realizadas extracciones de parénquima testicular de distintas zonas de la glándula hasta la obtención de espermatozoides móviles, en caso de no obtener espermatozoides en un testículo se procedió a realizar múltiples biopsias en el contralateral tal y como está recomendado en la literatura al respecto (11).

En los casos de azoospermia obstructiva (n=15), se realizó una disección de la cabeza del epidídimo; una vez abierta la serosa se procedió a la punción y aspiración utilizando una jeringuilla de 10 ml (con 500 µl de medio tamponado) con una aguja de 20 G. En los casos en que no se obtuvo espermatozoides móviles, se realizó una biopsia testicular para su obtención (n=4). Con el fin de evitar posibles sesgos por este hecho, se comparó los niveles de FSH de aquellos pacientes en que no se obtuvo espermatozoides móviles del epidídimo ( $3,4 \pm 0,1$  mUI/ml) con los niveles de aquellos en que si se recuperaron ( $4,2 \pm 2,2$  mUI/ml), no observando diferencias estadísticamente significativas (p=0,5).

Todos los casos fueron realizados por el mismo cirujano-urólogo.

### **Manejo de los espermatozoides en el laboratorio**

La aspiración epididimaria se realizó con una jeringuilla de 10 ml conteniendo 500 µl de un medio tamponado (Flushing medium Medicult, Dinamarca) que, tras la aspiración, fue transferido a una placa petri de doble pocillo y observado al microscopio invertido para comprobar la presencia de espermatozoides móviles. A continuación fue transferido a un tubo falcon de 15 ml al que se añadió un volumen de crioprotector (Freezing medium. Irvine, USA) igual al de la muestra. Todo el contenido fue distribuido en pajuelas de 0,5 ml, que se colocaron en un ambiente a 5 grados centígrados durante 20 minutos. Posteriormente las pajuelas fueron colocadas horizontalmente a 10 cm de la superficie de nitrógeno líquido para congelación rápida en los vapores del nitrógeno durante 20 minutos, tal y como ha sido descrito, (12) para después ser sumergido en nitrógeno líquido.

El tejido obtenido mediante biopsia testicular fue dislacerado bajo lupa estereoscópica con la ayuda de dos hojas de bisturí, y observadas con un microscopio invertido para comprobar la presencia de espermatozoides móviles. Una vez que la comprobación fue positiva, se añadió un volumen de crioprotector (Freezing medium Irvine, USA) similar al volumen de la muestra, y divididas en varios criotubos, los cuales fueron congelados de forma similar a la descrita para las muestras de origen epididimario.

La descongelación de las muestras obtenidas por biopsia testicular se realizó a temperatura ambiente bajo campana de flujo lamina. Una vez descongelada la muestra fue dividida en dos alícuotas en tubos falcon de 15 ml. Se añadió un volumen similar de un medio tamponado (Flushing medium Medicult, Dinamarca) y se centrifugó a 750 rpm durante 5 minutos con objeto de separar el tejido testicular de los espermatozoides; el sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo falcon de 15 ml y centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos en dos ocasiones para completar el proceso de lavado del crioprotector. El pellet obtenido fue resuspendido en medio tamponado (Flushing medium Medicult, Dinamarca) y colocado en gotas bajo aceite mineral en una placa petri, para esperar a que se produjera el fenómeno del "Swam out" (13, 14) en que los espermatozoides migran hacia la periferia de la gota de donde son captados y trasladados a una gota de polivinilpirrolidona (PVP) donde son inmovilizados para ser microinyectados.

La descongelación de las muestras de origen epi-

didimario se realizó a temperatura ambiente bajo campana de flujo laminar; en caso de que la muestra presentara un recuento mayor de 3 millones y una motilidad superior al 5% se realizó un "swim-up" tal y como lo describe Fernández PJ y cols. (15). En caso de presentar un recuento y motilidad inferior, la muestra fue procesada tal y como se ha descrito para las muestras de origen testicular.

### **Estimulación ovárica**

La estimulación ovárica se realizó bajo protocolo largo con la administración de acetato de leuprolide (Procrin Laboratorios Abbott. Madrid) a una dosis de 0,5 mg/día. Tras comprobar supresión hipofisaria se inició la administración de FSH-r (Gonal-F Lab. Serono. Madrid; Puregon Lab. Organon. Barcelona) a una dosis de 300 UI/día durante 5 días, tras lo cual la dosis diaria fue ajustada en función de la respuesta individual, tal y como está descrito previamente (16)

El control del desarrollo folicular se realizó con determinaciones de estradiol sérico y ecografía transvaginal.

En el momento que se observaron criterios de una adecuada madurez folicular (al menos 4 folículos en 16 mm y niveles de estradiol adecuados al desarrollo folicular) se indicó la administración de 10.000 UI de hCG (Profasi Serono. Madrid).

La punción folicular se llevó a cabo 35 horas tras la administración de la hCG, bajo guía ecográfica. La transferencia embrionaria fue realizada dos días tras la captación de los ovocitos.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo en un ordenador Macintosh, utilizando el paquete estadístico StatView. La significación de las diferencias fue estimada usando las pruebas de t de Student, chi-cuadrado y U de Man-Whitney. Las diferencias que mostraron valores de  $p < 0,05$  fueron consideradas estadísticamente significativas.

## **RESULTADOS**

### **Fecundación**

Fueron microinyectados un total de 156 ovocitos clasificados como metafase II, observándose signos de fecundación normal en 114 de ellos, lo que corresponde a un porcentaje de fecundación por ovocito del 73,1%.

La media de ovocitos microinyectados por pacien-

te fue de  $6,7 \pm 3,9$ ; observándose una media de  $4,9 \pm 3,1$  de ovocitos fecundados por paciente.

En función del origen de los espermatozoides (epidídimo/testículo) se dividió la muestra en dos grupos: Grupo I (n=11) en que los espermatozoides fueron obtenidos por punción-aspiración del epidídimo y Grupo II (n=12) en que los espermatozoides se obtuvieron por medio de biopsia testicular. En todos los casos se recuperó espermatozoides móviles tras la descongelación.

En el Grupo I se microinyectaron una media de  $7,0 \pm 4,9$  ovocitos por paciente y en el Grupo II  $6,5 \pm 2,9$  ovocitos; obteniéndose una media de  $5,5 \pm 3,7$  y  $4,4 \pm 2,6$  embriones por paciente en cada uno de los grupos respectivamente.

El total de ovocitos microinyectados en el Grupo I fue de 77 observándose fecundación en 61 de ellos, mientras que en el Grupo II se microinyectaron 79 ovocitos de los cuales fecundaron 53. Esto representó una tasa de fecundación por ovocito del 79,2% en el Grupo I y 67,08% en el Grupo II, lo que alcanzó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,03$ ). Tabla 1.

La tasa de fecundación en función del tipo de azoospermia fue de 77,1% cuando ésta fue obstructiva y de 64,7% cuando fue secretora, sin observar diferencia significativa ( $p=0,1$ ). Tabla 1.

**Tabla 1**

*Descripción y comparación de la tasa de fecundación por ovocito en función del origen de los espermatozoides y según el tipo de azoospermia.*

*a) Diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,03$ )*

	Ovocitos Microinyectado	Ovocitos fecundados	% de fecundación por ovocito
Epidídimo	77	61	79,2a
Testicular	79	53	67,08a
Azoospermia obstructiva	105	81	77,1
Azoospermia secretora	51	33	64,7

### Porcentaje de embarazo e implantación embrionaria

Fueron transferidos un total de 76 embriones, de los cuales implantaron 11, lo que representó una tasa de implantación por embrión transferido del 14,4%.

En el Grupo I (espermatozoides epididimarios) se transfirieron un total de 37 embriones, de los que implantaron 7, lo que representó una tasa de implanta-

ción por embrión del 18,9%, mientras que en el Grupo II (espermatozoides testiculares) de 39 embriones transferidos implantaron 4, lo que representó un 10,2%, diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,04$ ). Tabla 2

**Tabla 2**

*Descripción y comparación de la tasa de implantación por embrión transferido en función del origen de los espermatozoides y según el tipo de azoospermia.*  
*a) Diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,04$ )*

	Embriones transferidos	Sacos gestacionales	% de implantación por embrión
Epidídimo	37	7	18,9a
Testicular	39	4	10,2a
Azoospermia obstructiva	52	7	13,4
Azoospermia secretora	24	4	16,6

Comparando el porcentaje de implantación en función de que la azoospermia sea obstructiva o secretora, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, siendo este del 13,4% y 16,6% respectivamente.

El porcentaje de embarazo del total de los ciclos considerados fue del 34,7%, siendo del 25% en el grupo de pacientes en que se utilizó semen criopreservado de origen testicular y del 45,4% cuando el semen criopreservado fue de origen epididimario ( $p=0,5$ ).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Uno de los problemas que con mayor frecuencia se observa tras la descongelación de espermatozoides procedentes de testículo o epidídimo es la disminución de su motilidad en relación con la observada previamente a la congelación. Sin embargo, Bachtell y cols. (17) observan tras la descongelación de estas muestras, un gran número de espermatozoides viables, pese a haber perdido muchos de ellos su motilidad. Esto es especialmente patente cuando la muestra es de origen testicular en que los mencionados autores describen una motilidad tras descongelación del 4% mientras que tras la aplicación de tinción vital y HOS la viabilidad es del 53% y 52% respectivamente.

Esto podría ser un indicador para extender el uso de espermatozoides criopreservados de origen testicular/epididimario, partiendo de la premisa que el

principal parámetro de éxito de una ICSI es realizar la microinyección con un espermatozoide que simplemente esté vivo (18-19). Sin embargo, es necesario valorar el porcentaje de fecundación y embarazo para poder extender el uso de espermatozoides criopreservados de origen testicular/epididimario a todas las parejas que lo necesiten.

En el presente trabajo, en todos los casos se obtuvieron espermatozoides móviles suficientes para la realización de una ICSI, por lo que no fue necesario la aplicación de test de viabilidad o HOS.

La tasa de fecundación observada con espermatozoides epididimarios criopreservados, en la presente serie es similar a la descrita por diferentes autores con el uso de espermatozoides epididimarios frescos (20, 21, 22). De igual manera el porcentaje de embarazo descrito por los mismos utilizando espermatozoides frescos es similar al observado en el presente estudio con el uso de espermatozoides criopreservados. A nuestro conocimiento, en la literatura médica existen 4 trabajos publicados que realizan un análisis comparativo apareado de los resultados obtenidos con espermatozoides frescos y criopreservados en una misma pareja (12, 23, 24, 25) y en ninguno de ellos encuentran diferencias significativas en el porcentaje de fecundación y embarazo, (Tabla 3).

En contraste a lo descrito en el presente trabajo y otros autores respecto a la aparente eficacia del uso de espermatozoides criopreservados de origen epididimario, existen controversias cuando el origen de los espermatozoides es testicular. Derivado del hecho de que estos espermatozoides son considerados de peor calidad, tanto en fresco como tras congelar (26). Esto es corroborado en el presente estudio que observa un porcentaje de fecundación e implantación significativamente menor que con espermatozoides de origen epididimario.

Con respecto al porcentaje de fecundación con es-

**Tabla 3**

*Estudios pareados publicados en la literatura médica comparando los resultados del ICSI con espermatozoides frescos y congelados de origen epididimarios*

	Porcentaje de fecundación		Porcentaje de embarazo	
	Frescos	Congelados	Frescos	Congelados
Friedler y cols.	56	53	32	37
Hutchon y cols.	64	66	34,5	26,7
Tournaye y cols.	60,1	53	32,1	35,2
Cayan y cols.	58,4	62	31,6	36,8

permatozoides criopreservados de origen testicular, varios trabajos concuerdan en que los resultados obtenidos son similares a los observados con espermatozoides testiculares frescos (27, 28). Sin embargo, no sucede lo mismo con respecto al porcentaje de implantación embrionaria, ni con la tasa de gestación. De Croo I. y cols (29) comparando de forma retrospectiva los resultados obtenidos utilizando espermatozoides testiculares frescos y congelados, describen un porcentaje de fecundación similar, pero una tasa de implantación y gestación significativamente mayor cuando los espermatozoides testiculares utilizados eran frescos; resultados similares describen Friedler y cols. (30).

En el presente trabajo se observan resultados significativamente mejores con el uso de espermatozoides epididimarios que con los de origen testicular. Sin embargo, cuando comparamos los resultados obtenidos según el tipo de azoospermia (secretora u obstructiva) no se observaron diferencias significativas. Una posible explicación sería que en algunos casos de azoospermia obstructiva, no se obtuvieron espermatozoides del epidídimo y se tuvo que realizar una biopsia testicular para su obtención; así estos resultados apoyarían la idea de que los espermatozoides de origen testicular son de peor calidad que los epididimarios, sin tener en cuenta el tipo de azoospermia de que se trate.

En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo y a los descritos en la literatura al respecto, se podría considerar que la obtención de los espermatozoides y su criopreservación de forma previa a la estimulación ovárica de la mujer, además de ofrecer innegables ventajas, sería una alternativa eficaz en el tratamiento de la pareja estéril en que el varón es azoospermico, al menos en aquellos casos en que los espermatozoides son recuperados del epidídimo.

En el caso de los espermatozoides de origen testicular, el problema es múltiple; por una parte no existe la suficiente evidencia, ni a favor ni en contra, de la eficacia de los espermatozoides criopreservados. Por otra parte, intentar la recuperación de espermatozoides el mismo día de la captación ovocitaria tiene el riesgo de no obtenerlos, por lo que una buena alternativa sería establecer métodos diagnósticos que garanticen la recuperación de gametos en las azoospermias secretoras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Tournaye H, Devroey P, Liu J.:** 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. *Fertility and Sterility* 1994; 61: 1045-1051.
2. **Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M.:** Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342: 1237.
  3. **Comité Ejecutivo de la IFFS.:** Motpellier 1995. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con eyaculado, espermatozoides epididimarios y testiculares. En: *Procreación asistida*. Disponible en: URL: <http://www.mnet.fr/iffs/eart2.htm>
  4. **Mulhall JP, Burgess C, Cunningham D.:** Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non-obstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 1997; 49: 91-96.
  5. **Devroey P.:** Clinical application of new micromanipulative technologies to treat the male. *Human Reproduction* 1998; 13 (Suppl. 3): 112-122.
  6. **Mulhall JP, Cunningham D, Burgess C.:** The prevalence of mature whole spermatozoa in the testicular parenchyma of males with non-obstructive azoospermia. *Journal of Urology* 1996; 155: 365A.
  7. **Silber SJ, Nagy Z, Devroey P.:** Distribution of spermatogenin in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of man with germinal failure. *Human Reproduction* 1997; 12: 2422-2428.
  8. **Devroey P.:** Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1998; 13: 2045-2046.
  9. **Westlander G, Hamberger L, Hanson C, Lundin K, Nilsson L, S'derlund B, Werner C, Bergh C.:** Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Human Reproduction* 1999; 14: 118-122.
  10. **López-Baeza F, Quintero LA, Montañana V, Fernández P, Navarro I, Romeu A.:** Protocolo de asistencia a la azoospermia en reproducción asistida: experiencia preliminar. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 1999; 16: 209-222.
  11. **Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben-Yosef D, Gamzu R, Paz G, Lessing JB, Yogev L, Yavetz H.:** Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia-is necessary? *Human Reproduction* 1998; 13: 3081-3085.
  12. **Tournaye H, Merdad T, Silber S, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A.:** No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Human Reproduction* 1999; 14: 90-95.
  13. **Craft I, Tsirigotis M.:** Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 1995; 10: 1623-1626.
  14. **Nijs M, Vanderzwalmen B, Vandamme B.:** Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1996; 11: 2180-2185.
  15. **Fernández PJ, Luna C, Blanes R, Navarro I, Molina I, Dieguez L.:** Uso razonado de técnicas de selección espermática empleadas en reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 1998; 15: 13-28.
  16. **Quintero LA, Diez E, Peiró T, Abad A, Bosch E, Monzó A, Romeu A.:** Embarazo ectópico en pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida y cirugía de reconstrucción tubárica. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 1997; 14: 129-134.
  17. **Bachtell NE, Conaghan J, Turek PJ.:** The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Human Reproduction* 1999; 14: 3048-3051.
  18. **Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC.:** Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility & Sterility* 1994; 62: 639-641.
  19. **Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P.:** High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Human Reproduction* 1995; 10: 148-152.
  20. **Holden CA, Fuscaldó GF, Jackson P.:** Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility* 1997; 67: 81-87.
  21. **Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H.:** Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 1998; 13: 134-142.
  22. **Shibahara H, Hamada Y, Hasegawa A.:** Correlation between the motility of frozen-thawed epididymal spermatozoa and the outcome of intracytoplasmic injection. *International Journal of Andrology* 1999; 22: 324-328.
  23. **Friedler S, Raziell A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El L.:** The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia-a comparative study. *Human Reproduction* 1998; 13: 1872-1877.
  24. **Hutchon S, Thornton S, Hall J, Bishop M.:** Frozen-thawed epididymal sperm is effective for intracytoplasmic sperm injection: implications for the urologist. *Br. Journal of Urology* 1998; 81: 607-611.
  25. **Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens C, Ryan I, Schriock E, Turek P.:** A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same copules. *Human Reproduction* 2001; 16: 495-499.
  26. **Verheyen G, Nagy Z, Joris H.:** Quality of frozen/thawed

wed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertility & Sterility* 1997; 67: 74-80.

27. **Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, Lessing JB, Amit A.:** Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction* 1999; 14: 1794-1801.
28. **Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham 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. *Human Reproduction* 1997; 12: 734-739.
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 spermatozoa. *Human Reproduction* 1998; 13: 1893-1897.
30. **Friedler S, Raziel A, Soffer Y.:** Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia - a comparative study. *Fertility & Sterility* 1997; 68: 892-895.