

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRA-SONOGRAFIA COM
DOPPLERVELOCIMETRIA E ANÁLISE HORMONAL NA PREDIÇÃO DO
ACHADO DE ESPERMATOZÓIDES EM BIÓPSIA TESTICULAR DE
PACIENTES COM AZOOSPERMIA**

Autor: Carlos Augusto Bastos de Souza

Orientador: Eduardo Pandolfi Passos

Co-orientador: João Sabino Lahorgue Cunha Filho

Tese de Doutorado

Porto Alegre

2004

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRA-SONOGRAFIA COM
DOPPLERVELOCIMETRIA E ANÁLISE HORMONAL NA PREDIÇÃO DO
ACHADO DE ESPERMATOZÓIDES EM BIÓPSIA TESTICULAR DE
PACIENTES COM AZOOSPERMIA**

Autor: Carlos Augusto Bastos de Souza

Orientador: Eduardo Pandolfi Passos

Co-orientador: João Sabino Lahorgue Cunha Filho

Tese apresentada à Universidade

Federal do Rio Grande do Sul.

Faculdade de Medicina, para a obtenção

de Título de Doutor em Medicina.

Porto Alegre

2004

S729c Souza, Carlos Augusto Bastos de
Comparação entre a ultra-sonografia com dopplervelocimetria e
análise hormonal na predição do achado de espermatozóides em
biópsia testicular de pacientes com azoospermia / Carlos Augusto
Bastos de Souza ; orient. Eduardo Pandolfi Passos ; co-orient. João
Sabino Lahorgue Cunha Filho. – 2004.

109 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Medicina . Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Azospermia 2. Biópsia 3. Testículos 4. Hormônio testicular :
Análise 5. Ultra-sonografia doppler em cores I. Passos, Eduardo
Pandolfi II. Cunha Filho, João Sabino Lahorgue III. Título.

NLM: WJ 834

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

À Lauren a quem amo

Aos meus pais e minha irmã

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que auxiliaram nesta caminhada. As pessoas abaixo foram muito importantes em vários momentos devendo ser citadas. Agradeço:

- Ao Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos pela orientação e incentivo, além da amizade e exemplo de vida.
- Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro de Freitas pelas oportunidades, aprendizado e modelo de profissional.
- Ao Dr. João Sabino Cunha Filho que além de amigo, foi um exemplo desde o início do meu trabalho com seu apoio e orientação.
- Aos Prof. Dr. José Geraldo Lopes Ramos e Prof Dr. Sérgio Martins-Costa pelo apoio, oportunidades e orientação.
- Ao amigo Dr. Paulo Fagundes pela amizade, orientação e apoio.
- Aos amigos Dr. Luciano Machado de Oliveira, Dr. Marco Aurélio Costa Vieira e Alexandre Fonseca pelo incentivo em vários momentos de desânimo.
- À Dra. Mirela Foresti Jiménez pela amizade e exemplo de vida.
- Às amigas Lucrecia Bernardi e Rosana Berr Maiato pela compreensão e apoio.
- Ao Dr. Antonino Pompeu Pandolfi.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	6
Introdução.....	7
Revisão bibliográfica.....	9
1- Infertilidade e azoospermia.....	9
2- Obtenção de espermatozóides.....	11
3- Problemas relacionados à obtenção de espermatozóides.....	13
4- Fatores relacionados ao achado de espermatozóides.....	14
a- FSH	15
b- Inibina B	18
c- Ultra-sonografia com Dopplervelocimetria.....	22
Referências bibliográficas.....	27
Objetivos.....	35
<i>Artigo 1</i>	
<i>Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in non-obstructive azoospermic patients.....</i>	<i>36</i>
Fatores preditivos do achado de espermatozóides móveis na biópsia testicular em pacientes com azoospermia não obstrutiva.....	53
<i>Artigo 2</i>	
<i>Sperm recovery prediction in azoospermic patients using Doppler ultrasonography.....</i>	<i>71</i>
Predição da recuperação de espermatozóides em pacientes azoospérmicos utilizando a ultra-sonografia com Doppler.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

FSH – Hormônio folículo estimulante

FIV – Fertilização in-vitro

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

AZF – Fator da azoospermia

UI/L – Unidades internacionais por litro

ng/ml – Nanogramas por mililitro

LH – Hormônio luteinizante

PD – Ultra-sonografia com “Power” Dopplervelocimetria

IP – Índice de pulsatilidade

IR – Índice de resistência

AT – Artéria testicular

VIT – Vasos intratesticulares

INTRODUÇÃO

Infertilidade, ou impossibilidade de engravidar, é definida como a incapacidade de conceber após o período de um ano de manutenção de relações sexuais regulares sem o uso de nenhum método anticoncepcional. As causas de infertilidade podem ser masculinas e/ou femininas, sendo que cerca de 50% são diagnosticadas como de origem masculina (Sharif, 2000). Entre várias causas de infertilidade masculina, podemos citar: a oligoastenoteratospermia, a varicocele e a azoospermia. A azoospermia é definida como ausência de espermatozóides no ejaculado após análise microscópica e centrifugação em pelo menos 2 ejaculados. (WHO, 1999) A azoospermia ocorre em 1 a 2% dos homens inférteis, porém em centros de referência de infertilidade a prevalência desta patologia varia em torno de 20 a 30% dos casos de infertilidade de origem masculina. Os pacientes com azoospermia são habitualmente tratados com o uso das técnicas de reprodução assistida, pois na grande maioria dos casos os tratamentos clínico ou cirúrgico são ineficientes (Cha *et al.*, 1997).

As técnicas de reprodução assistida, entre elas a ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozóides), revolucionaram o tratamento dos pacientes azoospérmicos. Estes pacientes, que anteriormente eram diagnosticados e seu tratamento era a utilização da inseminação intrauterina com sêmen de doador ou a adoção, passaram a poder ter filhos com seu próprio material genético (Schoysman *et al.*, 1993). Entretanto, a possibilidade de recuperação de espermatozóides é fundamental para a continuidade do tratamento visando à gestação. Sendo assim, esses pacientes devem ser

submetidos a procedimentos para obtenção de espermatozóides e após à técnica de ICSI (Franco Jr. *et al.*, 1995). No entanto, a obtenção de espermatozóides possui um índice de sucesso variável com uma taxa elevada de falhas. Além disso, muitas vezes os pacientes devem ser submetidos a múltiplas biópsias ou punções testiculares; aumentando a agressão tecidual e o estresse psicológico a um paciente já fragilizado pela sua situação.

A pesquisa por marcadores, preditores do sucesso do procedimento de obtenção de espermatozóides em casos de azoospermia é uma realidade. Uma série de marcadores hormonais, citológicos, histológicos e ultra-sonográficos tem sido pesquisados sem, no entanto, obter os resultados esperados. Os marcadores estudados carecem da sensibilidade, especificidade, praticidade e segurança desejados.

Desta forma, com o objetivo de determinar um fator preditivo com o uso da ultra-sonografia com “power” Doppler e a avaliação hormonal para o achado de espermatozóides em casos de azoospermia estamos propondo este estudo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- Infertilidade e azoospermia

A infertilidade por causa masculina ocorre em cerca 50% dos casais inférteis, sendo sua prevalência variável, dependendo da população estudada (Kim & Lipshultz, 1997; Passos *et al.*, 2001). Em 30% dos casais ocorre associação de causas masculinas e femininas (Razvi *et al.*, 1999). Estima-se que 1% da população masculina possua o diagnóstico de azoospermia situação definida como ausência de espermatozóides no ejaculado após análise microscópica e centrifugação em pelo menos dois ejaculados (WHO, 1999). Em homens que procuram serviços de infertilidade a prevalência de azoospermia pode chegar a 20% (Stanwell-Smith & Hendry, 1984).

A importância e a prevalência da azoospermia têm modificado nos últimos anos. Esse aumento ocorreu por vários fatores como aumento do número de homens que receberam quimioterapia e/ou radioterapia devido a neoplasias malignas na infância e adolescência, maior sobrevivência dos pacientes tratados por neoplasia maligna, maior número de pesquisas e investimentos em infertilidade masculina e melhora nas possibilidades de tratamento dos pacientes azoospérmicos (Kim & Lipshultz, 1997).

No passado, o prognóstico reprodutivo dos pacientes com infertilidade masculina era reservado, no entanto com o advento da ICSI houve uma revolução nesta situação (Palermo *et al.*, 1992). Causas de infertilidade masculina que careciam de opções terapêuticas passaram a dispor de um tratamento que permitia aos casais terem filhos com seu próprio material genético (Schoysmann *et al.*, 1993).

Os pacientes azoospérmicos são classificados em dois tipos: obstrutivos e não-obstrutivos. Os pacientes com azoospermia obstrutiva possuem: volume testicular normal, presença de epidídimo palpável ou ausência de ductos deferentes, valores do hormônio folículo estimulante normais, além da presença na história de achados como: infecções, cirurgias ou abordagens pélvicas. Os pacientes com azoospermia não-obstrutiva são considerados como portadores de falência testicular e apresentam volume testicular normal ou reduzido, epidídimos não palpáveis, valores de FSH normais ou elevados, e história de orquite, radioterapia, quimioterapia, neoplasia maligna, criptorquidia ou trauma testicular, entre outras (Ezeh, 2000). As causas não-obstrutivas de azoospermia respondem por até 60% dos casos de azoospermia (Matsumiya *et al.*, 1994). Outras classificações e protocolos também são propostos, sem tanta aceitação como, por exemplo, a classificação em causas pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares (Sharif, 2000).

Em 1985, pesquisadores publicaram resultados do uso de fertilização “in-vitro” com uso de espermatozoides obtidos através da exploração epididimária, no entanto esses dados eram desanimadores com taxas de gestação de 7 a 10% por ciclo (Temple-Smith *et al.*, 1985). Já, os casos de azoospermia não-obstrutiva eram manejados com uso de reprodução assistida com sêmen de doador ou encaminhadas para adoção, não dispondo de outras opções já que não era possível obter espermatozoides para FIV ou a quantidade obtida dos mesmos era muito pequena para que houvesse resultados razoáveis e a técnica pudesse ser oferecida a esses pacientes (Craft *et al.*, 1993).

A introdução da FIV associada a ICSI com sucesso na prática clínica, revolucionou o tratamento da infertilidade de causa masculina (Palermo *et al.*,

1992). A técnica foi aplicada com sucesso em uma série de casos de infertilidade masculina que até pouco tempo não dispunham de tratamento adequado. Inicialmente, Craft *et al.* (1993) demonstraram a capacidade fertilizante de espermatozóides testiculares. Após, Schoysmann *et al.* (1993), Silber *et al.* (1995), obtiveram gestações utilizando espermatozóides testiculares em casos de azoospermia obstrutiva. Outros autores demonstraram gestações com uso de espermatozóides testiculares obtidos através de biópsia em pacientes com azoospermia não-obstrutiva, permitindo que esses pacientes pudessem ter a chance de ter filhos com seu próprio material genético, situação impossível na década anterior (Devroey *et al.*, 1994; Tournaye *et al.*, 1996; Nagy *et al.*, 1998).

Estes últimos fatos modificaram completamente a situação dos pacientes com azoospermia. Pacientes até bem pouco tempo sem nenhuma possibilidade de tratamento passaram para uma situação mais confortável onde opção razoável de sucesso passou a ser oferecida. No entanto, pacientes sem possibilidade de obtenção de espermatozóides no tecido espermático permanecem sem nenhuma opção terapêutica de terem filhos com seu material genético.

2- Obtenção de espermatozóides

Os primeiros relatos do uso da biópsia de testículo datam de 1913, quando Huhner (1913), demonstrou que pacientes azoospérmicos poderiam apresentar espermatogênese pela análise de material obtido através de punção aspirativa de testículo. Charny (1940) foi o primeiro autor a relatar o uso da biópsia de testículo na avaliação de infertilidade masculina, porém foi Hotchkiss em 1944 que introduziu a biópsia de testículo na prática clínica. Girgis *et al.*

(1969), publicaram os resultados de 10 anos de avaliação de biópsias de testículo em pacientes inférteis e concluíram que a “biópsia testicular ainda possui lugar no manejo de casos de esterilidade masculina para diagnóstico, prognóstico e avaliação dos resultados de cirurgia em azoospermia obstrutiva”.

Este quadro foi modificando gradativamente devido à carência de possibilidades terapêuticas para esses pacientes. Hargreaves & Jequier (1978), preconizaram que casos de azoospermia com níveis de FSH elevado e baixo volume testicular não necessitariam de maior avaliação diagnóstica, por se tratarem de casos de falência testicular onde uma biópsia de testículo seria realizada apenas para fins diagnósticos sem alterar a conduta terapêutica. Concluíram, também, que esses pacientes não possuiriam evidências de espermatogênese em qualquer parte do testículo. Jarow, Espeland, Lipshulk (1989) também demonstraram que a biópsia de testículo era um procedimento desnecessário em pacientes com azoospermia, volume testicular diminuído e níveis de FSH aumentado.

Em conjunto com o surgimento da ICSI, ocorreram progressos nos métodos de obtenção de espermatozóides e principalmente no interesse em encontrar espermatozóides para posterior utilização. Vários autores começaram a demonstrar a presença de focos de espermatogênese em pacientes, anteriormente, ditos como portadores de azoospermia não obstrutiva - falência gonadal (Turek *et al.*, 1995; Gilbauth *et al.*, 1994). Turek *et al.* (1995) demonstraram que 12% dos pacientes com síndrome de células de Sertoli apresentavam níveis de FSH normais, revelando que uma relação entre anormalidades das células de Sertoli, concentrações de FSH e focos de espermatogênese não poderia ser estabelecida. Gilbauth *et al.* (1994) foram

capazes de encontrar espermatozoides em 48% dos casos de pacientes azoospermicos com níveis séricos de FSH acima de 30 mUI/ml, um valor considerado elevado e que anteriormente era considerado sinal de falência testicular.

Os resultados da ICSI com espermatozoides testiculares são comparáveis àqueles obtidos com espermatozoides do ejaculado com Cha *et al.* (1997) descrevendo taxas de fertilização de até 70%. Mansour *et al.* (1997) descreveram taxas de fertilização de 54,4% e de gestação de 31,9% por ciclo. Com os resultados que passaram a ser obtidos com o uso da ICSI, o interesse pela avaliação dos pacientes com azoospermia não obstrutiva ressurgiu e a biópsia de testículo, um procedimento antes puramente diagnóstico, passou a ter papel chave na infertilidade masculina, pois os espermatozoides para a realização da ICSI são obtidos através das abordagens testiculares. Sendo assim, a biópsia tornou-se também um procedimento terapêutico além de diagnóstico para pacientes azoospermicos.

3- Problemas relacionados à obtenção de espermatozoides

Os métodos de obtenção de espermatozoides em casos de azoospermia incluem a punção aspirativa e a biópsia de testículo. Em casos de azoospermia obstrutiva os dois métodos possuem eficácia similar (Cha *et al.*, 1997), porém em casos de azoospermia não obstrutiva há diferença na obtenção de espermatozoides. A punção aspirativa em pacientes com azoospermia não obstrutiva está mais freqüentemente associada à falhas na obtenção de espermatozoides (Ezeh *et al.*, 1998). Esses pacientes usualmente possuem um quadro de falência gonadal, apresentando volume testicular reduzido. A punção

tem sido associada com a possibilidade de atrofia testicular pela possibilidade de lesão vascular e pela obtenção de uma pequena quantidade de material que nem sempre é representativa do estado testicular. Ou seja, a punção as cegas está associada com uma limitada efetividade e baixa segurança (Cha *et al.*, 1997).

A biópsia testicular possui melhores resultados em casos de azoospermia não obstrutiva. As complicações mais freqüentemente apresentadas são a formação de hematomas e infecção do sítio de cirurgia. A freqüência dessas complicações é baixa ocorrendo em menos de 5% dos casos (Schlegel & Su, 1997).

Infelizmente, 30 a 50 % dos pacientes azoospérmicos não obstrutivos não possuem espermatozóides no tecido testicular (Ben-Yosef *et al.*, 1999; Cha *et al.*, 1997). Desta forma, muitos casais podem ser submetidos a ciclos de indução da ovulação para fertilização “in vitro” e não haver a obtenção de espermatozóides, ocasionando estresse psicológico ao casal, além dos riscos da indução da ovulação na mulher e o custo financeiro.

Devido aos problemas relacionados ao método como a eficácia variável na população de homens azoospérmicos e as possíveis complicações a procura por um preditor do achado de espermatozóides em casos de azoospermia tem sido realizada.

4- Fatores relacionados ao achado de espermatozóides

A procura por fatores preditivos do achado de espermatozóides tem sido realizada em várias áreas. Marcadores sorológicos, citológicos, histológicos e genéticos têm sido pesquisados. O maior número de estudos concentram-se em

marcadores hormonais. O FSH e, posteriormente a inibina são os mais pesquisados.

a - FSH

Schultze *et al.* (1984) ao analisarem qualitativa e quantitativamente as amostras de biópsia testicular de pacientes azoospérmicos demonstraram que em 80,7% dos pacientes com níveis de FSH inferiores a 8 UI/ml era possível encontrar espermátides maduras, por outro lado em pacientes com FSH maior do que 8 UI/ml, espermátides eram presentes em apenas 28,9% dos casos. Os pacientes com FSH normal e espermátides maduras presentes apresentavam espermatozóides para tratamento com ICSI e em 12,2% destes casos as amostras eram heterogêneas quanto ao padrão de espermatogênese, apresentando diversos diagnósticos histológicos em uma mesma amostra. Já nos casos com FSH elevado e espermátides maduras presentes a heterogeneidade das amostras era maior, chegando a 51,5%. Portanto, os autores encontraram uma associação entre os valores de FSH e número de diagnósticos histológicos com o achado de espermatozóides.

Outros autores apesar de encontrarem uma associação entre os níveis de FSH e o achado de espermatozóides concluíram que o FSH não poderia ser considerado um fator preditivo adequado. Tournaye *et al.* (1997) ao avaliarem vários marcadores (FSH, análise seminal, histologia e volume testicular), foram capazes de encontrar espermatozóides em 73,4% das amostras. Declararam que, com exceção da histologia, nenhum outro fator predizia o sucesso da obtenção de espermatozóides e considerando as fortes implicações socioeconômicas, uma abordagem testicular previamente ao ciclo de ICSI seria

o mais adequado para essa população. Porém, no grupo com diagnóstico de aplasia de células germinativas a decisão de não realização de uma tentativa de obtenção de espermatozóides talvez devesse ser discutida mais seriamente com o casal. Em casos de parada de maturação os autores foram capazes de encontrar espermatozóides em 55% dos casos, e 86% em pacientes com síndrome de células de Sertoli. No entanto, mesmo a histologia não demonstrou sensibilidade e especificidade adequadas (58,8% de sensibilidade e 88,5% de especificidade). Não havendo até o momento um padrão-ouro adequado para a recuperação de espermatozóides testiculares (Ezeh, 2000).

Mulhall *et al.* (1997) concluíram que homens com azoospermia não-obstrutiva podem ter espermatozóides presentes independente da idade, níveis de FSH, histologia anterior e resultados da citologia durante a biópsia. Consideraram adequado orientar todos os pacientes para a possibilidade de obtenção de espermatozóides, visto que a citologia realizada durante a biópsia apresentou um índice de falsos negativos de 40%.

Na avaliação de 103 pacientes com diagnóstico de azoospermia, Jezek, Knuth, Schulze (1998) relataram a possibilidade de encontrar espermatozóides em pacientes com FSH muito elevado, contrariando as conclusões de Hargreave e Jequier (1978) de que pacientes com FSH elevado não possuíam produção espermática. No entanto, determinaram que com o aumento dos níveis de FSH há uma menor chance do achado de espermatozóides. Os pacientes com valores de FSH menores que 7,5 mUI/ml apresentavam espermatozóides em 96,2% da amostra. Naqueles pacientes, com o aumento dos níveis de FSH houve diminuição da taxa de recuperação de espermatozóides para 62%. Dados

similares àqueles descritos por outros autores (Jezek, Knuth, Schulze ,1998; Mulhall *et al.*, 1997).

Uma associação entre os níveis de FSH e volume testicular com os achados de hipoespermatogênese e síndrome de células de Sertoli ou parada de maturação foi demonstrada por. Ezeh, Moore, Cooke (1998a) No entanto, essas diferenças não foram associadas ao sucesso na obtenção de espermatozóides na biópsia para ICSI. Altos níveis de FSH e baixo volume testicular foram associados com baixa probabilidade do achado de espermatozóides em casos de azoospermia não-obstrutiva por Westlander *et al.* (1999). Estes autores não demonstraram associação entre o tipo histológico e o achado de espermatozóides. Merino *et al.* (1999) demonstraram que os níveis de FSH alterados foram a anormalidade mais comum presente em pacientes com azoospermia. Yaman *et al.* (1999) ao analisar uma população de 99 homens inférteis encontraram associação entre os valores de FSH e o achado de espermatozóides em pacientes com diagnóstico de síndrome de células de Sertoli na biópsia em comparação com pacientes com espermatogênese preservada. No entanto, não foram encontrados espermatozóides em pacientes com diagnóstico de hipoespermatogênese e parada de maturação.

Ben-Yosef *et al.* (1999) sugeriram que todos pacientes com azoospermia não-obstrutiva fossem orientados a realizar biópsia de testículo previamente ao ciclo de FIV-ICSI e que este material deveria ser criopreservado. Desta forma, evitam-se induções da ovulação desnecessárias, visto que até o momento não há fatores preditivos adequados para essa população heterogênea. Além disso, evita-se que os pacientes sejam submetidos a múltiplos procedimentos de

biópsia testicular reduzindo os custos e possíveis complicações associados ao procedimento.

Recentemente, nosso grupo demonstrou uma associação entre os níveis de FSH e o achado de espermatozóides móveis em casos de azoospermia. Encontraram que níveis de FSH inferiores a 18 UI/ml estão associados com o achado de espermatozóides móveis. E a presença de espermatozóides móveis estaria associada com uma melhor função desses espermatozóides para uso em fertilização assistida (Souza *et al.*, 2003).

Apesar da associação dos valores de FSH com o achado de espermatozóides carecia-se da presença de um marcador com melhor perfil preditivo. Desta forma, avançaram as pesquisas em busca de novos marcadores.

b – Inibina B

A Inibina pode ser definida como uma substância testicular não esteróide, produzida pelo epitélio seminífero inibindo especificamente a secreção de FSH. A família da Inibina é formada pelas inibinas A, B e α C. A inibina B é a única forma presente na circulação na vida fetal e em homens adultos, refletindo o estado funcional do epitélio seminífero, sendo assim seus níveis correlacionam-se com os níveis de FSH e espermatogênese (Anawalt *et al.*, 1996; Meachem, Nieschlag, Simoni, 2001).

A inibina B é um hormônio glicoproteico consistindo de duas subunidades covalentes unidas, uma unidade comum α e uma β que existe em duas formas A e B (Meachem, Nieschlag, Simoni, 2001). Apesar da associação entre inibina B e espermatogênese vários estudos falharam em demonstrar uma ligação

sistemática e inequívoca entre os dois fatos. A célula de Sertoli é considerada como a fonte predominante de inibina B, no entanto as células germinativas e as Leydig também a produzem, porém não contribuindo para o *pool* de inibina circulante. A secreção de inibina ocorre dentro dos túbulos seminíferos, e possui um ritmo diurno paralelo ao da testosterona. A principal função da inibina é o controle negativo da secreção de FSH (Hipler *et al.*, 2001). O FSH estimula a produção de inibina B no testículo e a inibina B inibe a secreção de FSH.

Estudos clínicos demonstraram uma forte relação inversa entre os níveis de inibina B e FSH. Nachtigall *et al.* (1996) demonstraram que a inibina B testicular é o principal regulador dos mecanismos de “feedback” do FSH ao correlacionar as concentrações de FSH em homens normais e inférteis com deficiência de GnRH durante terapia com GnRH.

Anderson *et al.* (1997) concluíram que os níveis de FSH e inibina são correlacionados, sem, no entanto, comprovar uma associação com a concentração espermática. Pierik *et al.* (1999) demonstraram que a inibina B é um útil marcador da espermatogênese. Esses autores demonstraram que haveria uma associação entre a presença de espermatozóides e os valores de inibina, propondo a inibina B como um marcador de atividade das células germinativas.

Lee *et al.* (2001) ao estudarem pacientes com e sem criptorquidismo demonstraram que pacientes férteis e com criptorquidismo possuem alteração de sua espermatogênese. A alteração dos níveis de inibina foi associada com uma diminuição na população de túbulos seminíferos, desta forma comprometendo o potencial de fertilidade. Nesses pacientes a diminuição nos níveis de inibina B, elevação nos níveis de FSH e menor densidade espermática

foi fortemente associada com infertilidade. Foresta *et al.* (2002) demonstraram que a secreção de inibina B não é modificada em pacientes com oligoastenoteratospermia e portadores de microdeleções do gene DAZ, sendo assim pacientes com este tipo de micro deleção possuem função normal das células de Sertoli, possuindo problemas na própria linhagem espermatogênica. Autores têm encontrado que os níveis séricos de inibina B são bons marcadores da espermatogênese, pois se correlacionam com níveis de FSH, volume testicular, e presença de células de Sertoli nos túbulos seminíferos (Foresta *et al.*, 1999a).

No entanto, a inibina B tem demonstrado algumas carências como fator preditivo do achado de espermatozóides em amostras testiculares de pacientes azoospérmicos. A inibina B reflete de forma mais acurada o quadro de azoospermia em pacientes com síndrome de células de Sertoli. Sua concentração é diminuída pela idade, concentrações do hormônio luteinizante e estradiol, sendo aumentada pelo volume testicular e hormônio estimulador da tireóide (Mahmoud *et al.*, 1998). Foresta *et al.* (1999a) demonstraram que pacientes com oligoastenoteratozoospermia apresentavam valores elevados de FSH e normais de inibina B.

Foresta *et al.* (1999b) e Jezek *et al.* (1998) demonstraram que, mesmo pacientes com níveis aumentados de FSH e diminuídos de inibina B, apresentaram espermatozóides recuperados através de biópsia testicular para FIV-ICSI. Foresta *et al.* (1999a) demonstraram que a produção de inibina B pelas células de Sertoli reflete interações entre estas células e as espermátides e que pacientes oligozoospérmicos com baixos níveis de inibina B e altos de FSH fazem parte de uma população com túbulos seminíferos atróficos. No entanto,

muitos casos apresentavam altos níveis de FSH que não eram associados com baixos níveis de inibina B provavelmente devido presença de função testicular residual.

Ballescá *et al.* (2000) ao avaliarem uma amostra de 17 pacientes azoospérmicos demonstraram que a inibina B pode ser um útil marcador não invasivo da espermatogênese. Os autores determinaram que níveis de inibina B acima de 40 pg/ml possuíam sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para o achado de espermatozóides em biópsias testiculares. Von Eckardstein *et al.* (1999) concluíram que inibina B e FSH são um fator preditivo mais sensível do estado de espermatogênese do que qualquer um deles utilizado isoladamente. A associação de inibina B e FSH apresentou sensibilidade de 88% e especificidade de 83% para a presença de espermátides alongadas na biópsia testicular, e de 63% para o achado de espermatozóides. Jezek *et al.* (1998) determinaram que nem altos níveis de FSH, nem baixos de inibina B excluem a possibilidade do achado de espermatozóides em casos de azoospermia não obstrutiva.

Muitos relatos sugerem que a recuperação de espermatozóides testiculares pode ser possível em mais de 50% dos casos de azoospermia não obstrutiva independente de parâmetros como volume testicular e níveis de FSH e que o aumento da taxa de sucesso está associada com o aumento da quantidade de material extraído (Ezeh, Moore, Cooke, 1998). Até o momento, a inibina isoladamente ou sua associação não pode determinar se o procedimento de obtenção de espermatozóides deve ser realizado. Esta diminuição da acurácia da Inibina B e do FSH pode estar associado a grande diversidade de

metodologias empregadas para avaliar seu poder de triagem dos casos de azoospermia e pela própria heterogeneidade da patologia azoospermia.

c - Ultra-sonografia com Dopplervelocimetria

A ultra-sonografia tem sido utilizada nos últimos trinta anos como ferramenta diagnóstica em uma série de patologias. Houve uma evolução nos aparelhos de ultra-sonografias da produção de imagens sem definição, com cores únicas e estáticas, para imagens de alta resolução em escalas de cinza e imagens com Doppler colorido e “power” Doppler. O ultra-som pode também ser utilizado para avaliar as propriedades elásticas e dinâmicas dos tecidos. Nos últimos vinte anos, seu uso na avaliação das estruturas do saco escrotal tem se tornado mais freqüente, e ainda que a ultra-sonografia convencional tenha realizado grandes avanços o uso do Doppler colorido é extremamente útil em pacientes selecionados (Oyen, 2002).

A ultra-sonografia com Doppler colorido que geralmente é baseada na medida do componente direcional da velocidade do sangue movendo-se através de uma secção transversal, tem comprovado ser uma útil arma no diagnóstico ultra-sonográfico. No entanto, possui algumas características que devem ser avaliadas com cuidado, pois pode haver alteração na avaliação do sinal de fluxo dependendo do ganho, limiar e ângulo de insonação. Para evitar esses problemas um método do Doppler colorido chamado de “power” Doppler procura mostrar um mapa colorido integrado do sinal captado de Doppler ao invés do uso dos índices. O “power” Doppler tem demonstrado ser mais sensível em sistemas vasculares de baixo fluxo e sua avaliação é independente do ângulo de

insonação. Desta forma, as características do “power” Doppler o tornam um método diagnóstico capaz de avaliar a microvascularização testicular. Diferentemente do Doppler colorido que consegue avaliar fluxo sanguíneo vascular, porém não possui capacidade de avaliar a microvascularização. O “power” Doppler é baseado no espectro integrado do Doppler colorido. O tom e o brilho do sinal do “power” Doppler representam o poder que está relacionado ao número de células sanguíneas produzindo o sinal de Doppler capaz de avaliar um sistema vascular como o testicular (Rubin *et al.*, 1994).

Atualmente, o uso da ultra-sonografia em infertilidade tem avançado muito. Os pacientes com infertilidade podem ter avaliado o volume e parênquima testicular, presença de ductos deferentes ou a presença de varicocele. A ultra-sonografia também permite a análise de outras estruturas, além dos testículos, como o acesso às glândulas acessórias (Yassa e Keessara, 2001; Belenky *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado a presença de alterações no fluxo sanguíneo de pacientes azoospérmicos. Os pacientes com azoospermia obstrutiva possuem parênquima testicular preservado, e desta forma, não possuiriam alteração no fluxo sanguíneo testicular (Foresta *et al.*, 1998). Por outro lado, pacientes com azoospermia não obstrutiva, ou seja, portadores de patologias testiculares primárias possuiriam estruturas testiculares completamente modificadas e com isso o fluxo sanguíneo intratesticular estaria modificado. Comprovando as alterações do fluxo vascular os autores procuram associá-las com o achado de espermatozóides em biópsia testicular, ou seja, que a avaliação do fluxo vascular através da ultra-sonografia consiga identificar os

pacientes azoospérmicos portadores de focos de espermatogênese (Foresta *et al.*, 1998; Bataglia *et al.*, 2000).

A estrutura testicular na azoospermia não obstrutiva é severamente alterada e os pacientes apresentam diminuição ou ausência de fluxo arterial intratesticular. Na azoospermia obstrutiva os testículos exibem uma perfusão uniforme como àquela observada em controles normais (Foresta *et al.*, 1998).

Foresta *et al.* (1998) avaliaram o ultra-som com “power” Doppler colorido em pacientes azoospérmicos como um parâmetro de função testicular. Estudaram 12 pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva com ultra-sonografia com “power” Doppler previamente ao procedimento de obtenção de espermatozóides. Encontraram que o “power” Doppler pode ser capaz de diferenciar pacientes com azoospermia obstrutiva que apresentaram melhor fluxo sanguíneo daqueles com azoospermia não obstrutiva. Demonstraram ainda que o uso da ultra-sonografia previamente à biópsia testicular poderia aumentar a chance de obtenção de espermatozóides por selecionar as áreas com melhor função. No entanto, não foram capazes de determinar a ultra-sonografia como um exame preditor do achado de espermatozóides.

Bataglia *et al.* (2000) determinaram que o fluxo intratesticular avaliado através das artérias transmediastinais foi significativamente diferente entre pacientes oligozoospérmicos, azoospérmicos e normozoospérmicos. Possuindo uma correlação inversa entre os valores de índices de pulsatilidade das artérias transmediastinais e volume testicular. Em outra pesquisa, Bataglia *et al.* (2001) determinaram que a análise do fluxo da artéria transmediastinal através de ultra-sonografia Doppler era capaz de diferenciar pacientes com azoospermia não

obstrutiva dos obstrutivos e permitiria a predição do achado de espermatozóides testiculares.

Analisando apenas dados de Doppler colorido, sem utilizar o “power” Doppler, autores não foram capazes de encontrar diferenças nos índices de resistência e pulsatilidade das artérias intratesticulares entre pacientes com azoospermia não obstrutiva e controles férteis (Har-Toov *et al.*, 2001), demonstrando a necessidade da associação do “power” Doppler na análise do fluxo vascular intratesticular. Belenky *et al.* (2001) ao avaliarem o uso do “power” Doppler para auxílio em punção aspirativa de testículo com objetivo de obtenção de espermatozóides determinaram que o seu uso deveria ser estimulado, pois garantiria melhor acurácia e segurança na obtenção de espermatozóides.

Alguns autores procuraram mapear o fluxo vascular intratesticular. Eytan *et al.* (2001) desenvolveram um sistema de imagem baseado na técnica de ultrasonografia com “power” Doppler para prever os locais de maior potencial para espermatogênese. Esses autores realizaram um mapeamento testicular com a construção de uma matriz tridimensional do testículo através de sete secções cruzadas, com isso foram aptos a construir um mapa espacial das regiões onde os focos de espermatogênese são mais prováveis de existirem. No entanto a complexidade do processo dificulta sua reprodutibilidade.

A ultra-sonografia para avaliar a microvascularização pode ser uma boa opção na busca por um preditor do achado de espermatozóides em casos de azoospermia. É um método não invasivo e acessível a todos centros de infertilidade. Desta forma, poderão ser diferenciados os pacientes quanto a presença de focos de espermatogênese avaliados através da ultra-sonografia com dopplervelocimetria. A associação da microvascularização com

espermatogênese poderia então ser utilizada como um método preditivo do achado de espermatozóides. Para avaliar se a avaliação de níveis hormonais e a ultra-sonografia com dopplervelocimetria são capazes de serem utilizados como métodos preditivos do achado de espermatozóides na biópsia testicular em casos de azoospermia foi proposto este estudo.

Referências bibliográficas

- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNelly AS, et al. Serum inhibin B concentrations reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3341-5.
- Anderson RA, Wallace EM, Groome NP, Bellis AJ, Wu FC. Physiological relationship between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Hum Reprod* 1997; 12: 746-51.
- Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, Osaba MJM, et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstrutive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1734-8.
- Battaglia C, Giulini S, Regnani G, Girolamo R, Paganelli S, Facchinetti F, Volpe A. Seminal plasma nitrite/nitrate and intratesticular Doppler flow in fertile and infertile subjects. *Human Reprod* 2000; 15: 2554-8.
- Battaglia C, Giulini S, Regnani G, Madgar I, Facchinetti F, Volpe A. Intratesticular doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates, and nonobstrutive sperm extraction from patients with obstrutive and nonobstrutive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 75: 1088-94.
- Belenky A, Avrech OM, Bachar GN, Zucckerman Z, Rafael ZB, Fisch B, Cohen M. Ultrasound Guided testicular sperm aspiration in azoospermic patients: a new sperm retrieval method for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Ultrasound* 2001; 29: 339-43.

- Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, 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-obstrutive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 1794-1801.
- Cha KY, Oum KB, Kim HJ. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 985-95.
- Charny CW. Testicular biopsy. *JAMA* 1940; 115: 1429-33.
- Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilizing ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342: 864.
- 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. *Fertil Steril* 1994; 62: 639-41.
- Ezeh UIO, Moore HDM, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* 1998; 13: 3066-74.
- Ezeh UIO, Moore HDM, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstrutive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13: 3075-80.
- Ezeh UIO. Beyond the clinical classification of azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 2356-9.
- Eythan O, Har-Toov J, Fait G, Yavetz H, Hauser R, Yogev L, Botchan A, Ben-Yosef D, Elad D, Jaffa AJ. Vascularity index distribution within the testis: a technique for guiding testicular sperm extraction. *Ultrasound in Med Biol* 2001; 21: 1171-6.

- Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998; 13: 3090-3.
- Foresta C, Bettelle A, Petraglia F, Pistorello M, Luisi S, Rossato M. Inhibin B levels in azoospermic subjects with cytologically characterized testicular pathology. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 695-701.
- Foresta C, Bettella A, Rossato M, La Sala G, De Paoli M, Plebani M. Inhibin B plasma concentrations in oligozoospermic subjects before and after therapy with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1999; 14: 906-12.
- Franco Jr, Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Freitas EF, Ursolino G. Tratamento do fator masculino grave em infertilidade pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Primeiras gestações obtidas com a coleta de espermatozoides do testículo. *RBGO* 1995; 17: 967-76.
- Gilbauth JH, Patel VR, Turek PJ, Lipshultz LI. Testis biopsy findings in azoospermic patients with markedly elevated serum FSH levels. (Abstract 0-130) 50th Annual Meeting American Fertility Society, 1994 Nov 5-10, San Antonio, p. 63.
- Girgis SM, Etriby A, Ibrahim AA, Kahil SA. Testicular biopsy in azoospermia. *Fertil Steril* 1969; 20: 467-77.
- Har-Toov J, Fait G, Hauser R, Wolman I, Yavetz H, Jaffa AJ. Can Doppler ultrasonographic measurements of the testis predict spermatozoa retrieval in azoospermic patients undergoing testicular biopsy? *Fertil Steril* 2001; 76: 1276-7.

- Hargreave TB, Jequier AM. Can follicle stimulating hormone estimation replace testicular biopsy in the diagnosis of obstructive azoospermia? *Br J Urol* 1978; 50: 415-8.
- Hipler U, Hochheim B, KnöllB, Tittelbach J, Schreiber G. Serum inhibin B as a marker for spermatogenesis. *Arch Androl* 2001; 46: 217-22.
- Huhner M. Sterility in the male and female and its treatment. New York, Rebman Company, 1913.
- Jarow JP, Espeland MA, Lipshulk LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989; 142: 62-5.
- Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone levels values in 103 infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 1230-4.
- Kim ED, Lipshultz LI. Male subfertility: diagnostic and therapeutic advances. *Brit J Urol* 1997; 80: 633-41.
- Lee PA, Coughlin MT, Bellinger MK. InhibinB: Comparison with indexes of fertility among formerly cryptorchid and control men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2576-84.
- Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE. The clinical and biological significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 591-9.
- 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.

- Matsumiya K, Namiki M, Takahara S, Kondoh N, Takada S, Kiyohara H, et al. Clinical study of azoospermia. *Int J Androl* 1994; 17: 140-2.
- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 561-71.
- Merino G, Martínez-Chequer, Chan RG, Cuevas ML, Carranza-Lira S. Relationship between hormone levels and testicular biopsies of azoospermic men. *Arch Androl* 1999; 42: 145-9.
- Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates R. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstrutive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urol* 1997; 49: 91-7.
- Nachtigall LB, Boepple PA, Seminara SB, Khoury RH, Sluss PM, Lecain AE, et al. Inhibin B secretion in males with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) deficiency before and during long-term GnRH replacement: relationship to spontaneous puberty, testicular volume and prior treatment – a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3520-5.
- Nagy ZP, Verheyen G, Liu J, Joris H, Janssenswillen c, Wisanto A, et al. Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male immunological infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 1775-80.
- Nagy ZP, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, DevroeyP, Van Steirteghem AC. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 890-5.

- Oyen RH. Scrotal ultrasound. *Eur Radiol* 2002; 12: 19-34.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
- Passos EP, Freitas F, Cunha Filho JSL, Facin A, Souza CAB, Salazar CC. Infertilidade. In: Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP. *Rotinas em Ginecologia*. 4 th ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001. p 434-442.
- Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, DeJong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 83: 3110-4.
- Razvi K, Chew S, Yong EL, Kumar J, Ng SC. The clinical management of male infertility. *Singapore Med J* 1999; 40: 291-7.
- Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL, Adler RS. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiol* 1994; 190: 853-6.
- Schlegel PN, Chang TSK. The testis, epididymis and ductus deferens. In Walsh PC, Retik AB, Stamey TW, Vaughan ED. *Campbell's Urology*, 6th ed. WB Saunders: Philadelphia; 1991, p 190.
- Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-92.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, Van de Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1993; 8: 1339-40.
- Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod* 2000; 15: 237-8.

- Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1984; 18; 1.
- 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. *Hum Reprod* 1995; 10: 148-52.
- Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 1997; 12:2422-8.
- Souza CAB, Cunha Filho JS, Santos D, Gratão A, Filippon L, Tedesco C, Freitas FM, Passos EP. Hormônio folículo estimulante como preditor do achado de espermatozoides móveis na biópsia testicular de casos de azoospermia. *Assoc Med Bras* 2003; 49: 167-72.
- Souza CAB, Cunha Filho JS, Santos D, Gratão A, Freitas FM, Passos EP. Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in nonobstructive azoospermic patients. *Int Urol Nephrol* 2003; 35: 53-7.
- Stanwell-Smith RE, Hendry WF. The prognosis of male infertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic. *Br J Urol* 1984; 56: 422-8.
- Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, De Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2: 119-22.
- Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goosens A, Silber S, et al. Correlation between testicular histology and the outcome after

intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 127-32.

- Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Siber S, et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-6.
- Turek PJ, Kim M, Gilbauth JH, Lipshultz LI. The clinical characteristics of 82 patients with Sertoli-cell-only testis histology. *Fertil Steril* 1995; 64: 1197.
- 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: 2496-2501.
- Westlander G, Hamberger L, Hanson C, Lundin K, Nilsson L, Söderlund B, et al. Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 118-122.
- World Health Organization(1999) Laboratory Manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- Yaman O, Özdiler E, Seckiner I, Gögüs O. Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nefrol* 1999; 31: 519-23.
- Yassa NA, Keessara S. Role of transrectal ultrasonography in evaluating the cause of azoospermia. *JACR* 2001; 52: 266-8.

OBJETIVOS

Avaliar a microvascularização testicular através da ultra-sonografia com dopplervelocimetria e níveis séricos hormonais como fatores preditivos do achado de espermatozóides em biópsia testicular de pacientes com azoospermia.

Running head: Motile sperm in azoospermia

Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in non-obstructive azoospermic patients

Souza CAB, MD*

Cunha Filho JS, MD, Ph*

D Santos D, MD*

Gratão A, Med Vet, MSc*

Freitas FM, MD, PhD*

Passos EP, MD, PhD*

*Human Reproduction Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence:

Human Reproduction Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Carlos Augusto Bastos de Souza, MD

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1135

90035-003 - Porto Alegre, RS - Brazil

Phone: +55-51-3316-8117

Fax: +55-51-3332-3523

E-mail: casouza@via-rs.net

Artigo publicado na International Urology and Nephrology 2003; 35:53-7.

Abstract

Objective: The objective of the present study was to assess the predictive value of hormone values, histological analysis for the finding of motile spermatozoa on testicular biopsy in non obstructive azoospermia.

Methods: This cross-sectional study assessed serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone, prolactin and total testosterone values in 50 patients undergoing testicular biopsy prior to ICSI. $P < 0.05$ was considered significant.

Results: Recovery was successful in 28 cases, and motile spermatozoa were retrieved in 7. Significant differences were detected between presence of motile spermatozoa and absence of spermatozoa in terms of FSH values ($P = 0.003$, one-way ANOVA). The other variables did not present statistical differences. A receiver operating characteristic curve showed that FSH levels below 17.00 IU/L were predictive of motile spermatozoa recovery.

Conclusions: FSH values can serve as a predictive factor for the recovery of motile spermatozoa using biopsy in azoospermic patients. On the other hand, histological analysis and other hormone values were not helpful in the prediction of motile sperm.

Key words: azoospermia / biopsy / infertility, male / mobile spermatozoa / testicle

Introduction

The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique has been used in the treatment of several forms of male infertility as oligozoospermia and azoospermia (1-3). Although both motile and nonmotile spermatozoa may be used in ICSI, fertilization and pregnancy rates are lower with nonmotile sperms (4).

Spermatozoa obtained from azoospermic patients are often nonmotile, being associated with the worse results observed after ICSI in these cases. In addition, the sperm recovery process is not always successful, especially in patients with non obstructive azoospermia; failure rates may reach 50% (5-6). When spermatozoa are not found, ovulation induction cycles are missed (7). Apart from the high failure rates, testicular biopsy is associated with alterations in the vascular system, bruising and infections (8). Both factors combined have motivated the investigation of predictive factors for successful sperm recovery in non obstructive azoospermic patients.

Some investigators have suggested that high levels of follicle-stimulating hormone (FSH) could serve as a marker for deficient spermatogenesis (9-11). However, other investigators were unable to identify FSH as an appropriate predictive factor for successful spermatozoa recovery (12). Other indicators, such as inhibin B, histological analysis results or presence of spermatids, have also been tested, but presented contradictory results (5,6,13,14).

Despite the great number of studies assessing the predictive factors for sperm recovery, these studies focus on sperm in general. There are few data about the predictive value of such parameters for the specific finding of motile spermatozoa on biopsy in azoospermic patients.

Therefore, the objective of the present study was to assess the predictive value of hormone dosage, histological analysis, and testicular volume for the recovery of motile spermatozoa using biopsy in azoospermic non obstructive patients.

Materials and methods

Design

A cross-sectional study was carried out between January 1998 and December 2001 at the Human Reproduction Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, with patients being treated for infertility.

Patients

Fifty patients with the diagnosis of non obstructive azoospermia were included in the study. Written informed consent was obtained from all patients included in the study. The protocol was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (028/98).

Hormone values

Patients were submitted to dosage of FSH, luteinizing hormone, prolactin, and total testosterone in the first visit for diagnostic evaluation. Samples were centrifuged at 2500 rpm for separation of plasma and frozen at -20 °C for later analysis. FSH, luteinizing hormone, and prolactin were analyzed with chemoluminescence kits (Immulite, Los Angeles, CA); testosterone was assessed by means of radioimmunoassay (ICN , Germany). Inter- and intrakit

variations were 5.45 and 13.3%, respectively, for prolactin; 2.8 and 4.2% for FSH; 2.6 and 3.8% for luteinizing hormone; and 3.3 and 4.9% for total testosterone. The kits did not show significant cross-reaction between the hormones evaluated.

Sperm recovery

Patients were submitted to testicular biopsy prior to the ICSI cycle (10). A small longitudinal scrotal incision was performed to expose the tunica albuginea and to allow visualization of the vessels underneath it. Two or three incisions were made in the tunica albuginea at different positions in each testicle, avoiding the vessels and testicular tissue was extracted. The samples were extracted in a random fashion and divided into quartiles. The first quartile was sent for histological analysis. The remaining specimens were placed in a Petri dish and immediately sent to the adjacent reproduction biology laboratory.

Specimen processing

Specimens were processed as previously described (3). Testicular tissue was placed in a Petri dish containing 1 ml of P1 medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) and 10% synthetic serum substitute (SSS) (Test Yolk Buffer, Irvine Scientific). The tissue was macerated, and the resulting fluid was centrifuged at 1000 x g. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1 ml of medium (P1 + SSS). Samples were frozen by exposure of the pellets to nitrogen vapor (-120 °C) for 20 minutes and transferred to liquid nitrogen for storage. They were classified into three groups in two moments: presence of motile sperm, presence of nonmotile sperm, and absence of sperm. The first

moment was immediately after the biopsy and a second moment 24 hours after incubation.

Histological analysis

Histology was performed at the pathology laboratory in our Service. The histological findings were classified into five categories: normal spermatogenesis, hypospermatogenesis, Sertoli cell-only syndrome, sperm maturation arrest, and tubular sclerosis.

Hypospermatogenesis was defined as the presence of seminiferous tubules containing few spermatids and a decreased number of spermatogonia and primary spermatocytes. Sertoli cell-only syndrome was diagnosed when the seminiferous tubules presented only Sertoli cells. Sperm maturation arrest was defined in the presence of fewer than 17 spermatogonia in each tubule and a lower number of primary spermatocytes, with absence of spermatids. Tubular sclerosis included cases with absence of germ cells and Sertoli cells. The pathologists responsible for making these diagnoses were blinded to patient characteristics and spermatozoa recovery results.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the SPSS 9.0 software. Quantitative variables were analyzed using one-way variance analysis (one-way ANOVA) and Bonferroni's test for comparison of differences. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted for analysis of the predictive value of different quantitative variables. In the ROC curve, the peak of accuracy for motile spermatozoa recovery using testicular biopsy was defined in comparison with

nonmotile spermatozoa recovery and the absence of spermatozoa. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Our sample included 50 patients. The spermatozoa recovery was successful in 28 (56%) cases. We are able to find motile spermatozoa in 7 patients, and nonmotile in 21 in the immediate analysis. Motile spermatozoa were retrieved in 12 patients, and nonmotile in 16 in the analysis 24 hours after.

Table 1 shows the results of spermatozoa recovery according to the variables studied in the moment after the biopsy. A statistically significant difference was detected between presence of spermatozoa and absence of spermatozoa in terms of FSH levels ($P = 0.003$). The table 2 shows the results of spermatozoa recovery (motile *versus* nonmotile sperm) according to the variables studied 24 hours after the biopsy. We are able to find a statistically significant difference detected between presence of motile spermatozoa and total absence of spermatozoa in terms of FSH levels ($P = 0.003$). The other variables – hormone values (other than FSH), testicular volume, and histological analysis – were not statistically different in both moments of evaluation.

Figure 1 shows the ROC curve calculated to assess the predictive value of FSH levels for the finding of motile spermatozoa. Based on the ROC curve, the best FSH levels to predict motile spermatozoa recovery were those below 17.00 IU/L, with a sensitivity of 81.8% and a specificity of 60.7%. In the analysis 24 after biopsy the FSH levels were below 18.80 UI/L - sensitivity of 72.7% and a specificity of 65.3% - to find motile spermatozoa. Table 3 shows spermatozoa recovery according to histological findings.

Discussion

Among the variables analyzed in the present study, only FSH showed a significant correlation with testicular spermatogenesis – levels below 17.00 IU/L had a high predictive value for the finding of motile spermatozoa on immediately analysis of biopsy in azoospermic patients. In addition, levels below 18.80 IU/L had a high predictive value for the finding of motile spermatozoa on analysis 24 after biopsy. There was no correlation between motile spermatozoa recovery and the histological analysis, and the other hormone values (Table I). Our data are compatible with the affirmation that FSH is able to predict the success for finding motile spermatozoa in non obstructive azoospermic patients.

Other investigators have already demonstrated an association between FSH levels and degree of testicular pathology (11). In a study with 86 patients with nonobstructive azoospermia, the group with the lowest levels of FSH was the most likely to achieve successful spermatozoa recovery (15). This data are similar with the observing that the rate of spermatozoa recovery obtained in their study was inversely proportional to FSH levels (12).

In some studies spermatozoa were recovered in many patients in spite of high FSH levels(6,11,12,15). This suggests that even patients with high FSH levels may present some degree of spermatogenesis (15). Even though all those studies indicate a correlation between FSH and spermatogenesis, they do not assess the predictive value of FSH levels for the presence of motile spermatozoa, which are the most adequate for ICSI.

With the aim of increasing the diagnostic power of FSH, authors suggested the correlation of FSH and inhibin B for the analysis of azoospermic

patients (14). Those authors demonstrated that the accuracy of testicular volume and FSH was similar – approximately 70% for predicting successful in vitro fertilization – and stated that the use of inhibin B as an indicator of spermatogenesis should be encouraged due to its increased diagnostic accuracy (94.1%). In our study, inhibin B levels were not included in the hormonal analysis, since the relevance of this hormone to spermatogenesis had not been validated when the study was started, in 1998. Nevertheless, despite the positive findings, other authors have reported unfavorable results with inhibin B(14). Inhibin B has been demonstrated as a better tool for discriminating spermatogenesis than FSH, but that is was not an accurate predictive factor for successful spermatozoa recovery (13).

A great number of azoospermic patients present only nonmotile spermatozoa; this was confirmed by our results (7 motile versus 21 nonmotile in immediate analysis and 12 versus 16 in 24 hours analysis). Nonmotile spermatozoa have been associated with lower rates of fertilization and pregnancy after ICSI when compared to motile spermatozoa, although authors had found no significant difference in the number of embryos and in the insemination potential (16).

In addition, when nonmotile spermatozoa are to be used in ICSI, the assessment of sperm vitality becomes more difficult, since parameters other than motility need to be analyzed. Despite the development of hyposmotic tests that are not toxic for spermatozoa, and of other tests such as the tail-to-head ratio, all procedures involve sperm handling and are therefore associated with potential lesions to the plasmatic membrane and decreased ability to fertilize(17). Thus, the finding of motile spermatozoa in the testicular tissue of azoospermic patients

is extremely important for the success of ICSI. The great part of the studies do not evaluate the research of motile spermatozoa because independently of the kind of spermatozoas found these will be used in ICSI. However the information of predictive factors is important for the orientation of patients with non obstructive azoospermia that will be submitted to a testicular biopsy before the procedure realization.

The other hormone dosages (LH, prolactin and testosterone) were not helpful in the prediction of motile sperm. These data are compatible with the knowledge about the physiology of these hormones. These are used to diagnosis other pathologies that can modify the infertility treatment and not represent the testicular spermatogenesis.

We did not find the differences between histological findings and results concerning spermatozoa recovery. Histological data are not adequate to predict spermatozoa recovery because they are only valid in patients who have previously undergone a testicular surgical procedure, and since the absence of sperm in a preliminary biopsy procedure does not necessarily mean that future biopsies will not be successful to obtain sperm (12).

In conclusion, FSH levels can serve as a predictor for motile sperm recovery using biopsy in azoospermic patients. In our population, FSH levels below 16.05 IU/L were significantly associated with the finding of motile spermatozoa. On the other hand, histological analysis, testicular volume, and other hormone dosages were not helpful in the prediction of motile sperm. We suggest that further studies be carried out to assess the contribution of the dosage of inhibin B or antimullerian hormone on the predictive value of FSH for the finding of motile spermatozoa in azoospermia.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support received from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. We are also grateful for the editorial support provided by the Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

References

1. Franco Jr. JG, Petersen CG, Mauri AL et al. Tratamento do fator masculino grave em infertilidade pela injeção intracitoplasmática de espermatozóides – Primeiras gestações obtidas com a coleta de espermatozóides do testículo. *RBGO* 1995; 17: 967-76.
2. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62: 639-641.
3. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Nagy Z et al. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66: 331-334.
4. Nagy ZP, Joris H, Verheyen G et al. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 890-895.
5. Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D et al. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 1997; 49: 91-97.

6. Ezech UIO, Moore HDM, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* 1998; 13: 3066-3074.
7. Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R 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: 1794-1801.
8. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-1692.
9. Hargreave TB, Jequier AM. Can follicle stimulating hormone estimation replace testicular biopsy in the diagnosis of obstructive azoospermia? *Br J Urol* 1978; 50: 415-418.
10. Westlander G, Hamberger L, Hanson C et al. Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 118-122.
11. Yaman O, Ozdiler E, Seckiner I et al. Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nephrol* 1999; 31: 519-523.
12. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-86.
13. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M 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: 2496-2501.

14. Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1734-1738.
15. Cha KY, Oum KB, Kim HJ. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 985-995.
16. Shulman A, Feldman B, Madgar I et al. In-vitro fertilization treatment for severe male factor: fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. *Hum Reprod* 1999; 14: 749-752.
17. Marmar JL, Corson SL, Gibbs M et al. Tail to head ratio of fresh and frozen testicular sperm as measure of viability. *J Androl* 1998; 19: 58.

Table 1. Correlation between sperm characteristics and the variables studied immediately after biopsy.

	Motile spermatozoa (n=7)	Nonmotile spermatozoa (n=21)	Absent (n=22)	<i>P</i>
FSH (IU/L)	14,60 ^a (±5,97)	18,66 ^a (±6,98)	25,71 ^a (±9,628)	0,003 ^b .
Luteinizing hormone (IU/L)	8,15 (±4,84)	10,94 (±6,24)	14,82 (±10,20)	0,115 ^b .
Prolactin (ng/ml)	6,34 (±1,74)	8,39 (±3,04)	7,93 (±3,09)	0,324 ^b .
Testosterone (ng/ml)	3,08 (±0,16)	3,92(±0,56)	4,33 (±1,02)	0,140 ^b .

FSH: follicle-stimulating hormone

^a Significant

^b One-way ANOVA

Table 2. Correlation between sperm characteristics and the variables studied 24 hours after biopsy.

	Motile spermatozoa (n=12)	Nonmotile spermatozoa (n=16)	Absent (n=21)	<i>P</i>
FSH (IU/L)	13,77 ^a (±4,64)	20,55 (±6,93)	25,71 ^a (±9,628)	0,0001 ^b .
Luteinizing hormone (IU/L)	8,36 (±4,54)	11,65 (±6,62)	14,82 (±10,20)	0,089 ^b .
Prolactin (ng/ml)	7,12 (±2,35)	8,45 (±3,57)	7,93 (±3,09)	0,545 ^b .
Testosterone (ng/ml)	3,83 (±0,40)	3,94(±0,56)	4,33 (±1,02)	0,140 ^b .

FSH: follicle-stimulating hormone

^a Significant

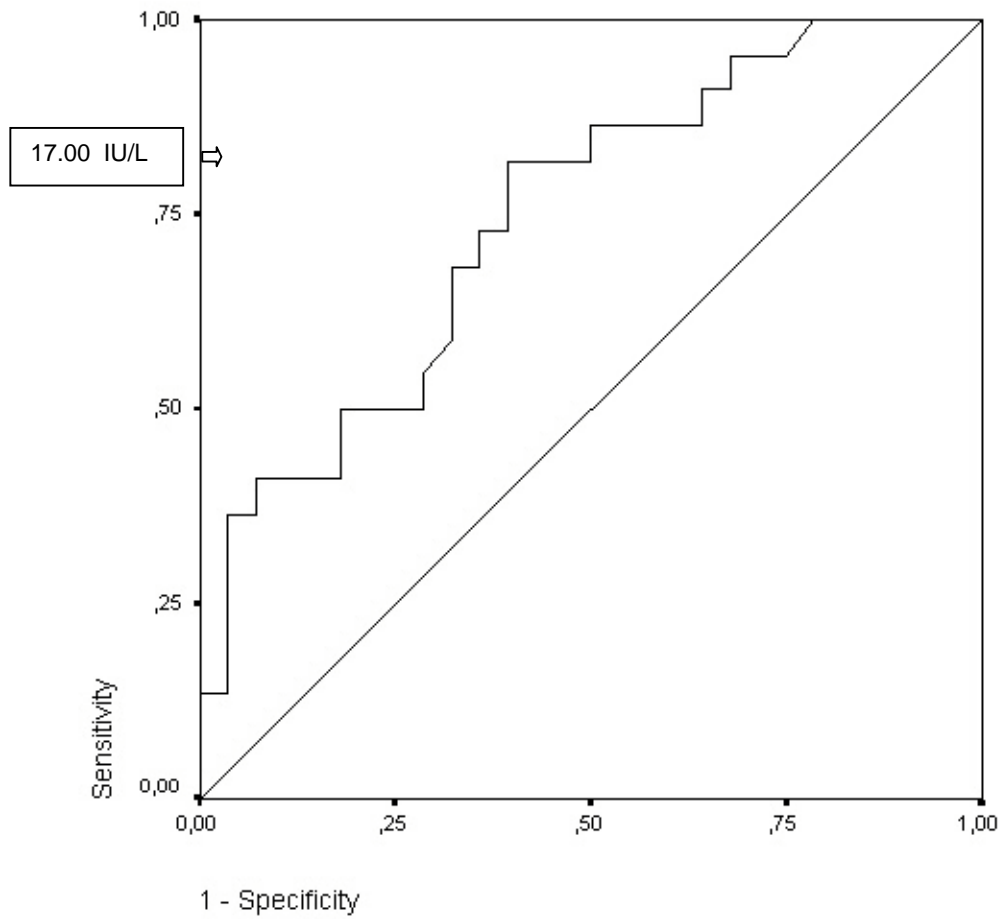
^b One-way ANOVA

Table 3. Histological diagnoses according to sperm recovery findings

	Motile spermatozoa (n=7)	Nonmotile spermatozoa (n=21)	Absent (n=22)
Normal spermatogenesis	1(2%)	5(10%)	0
Sertoli cell-only syndrome	2(4%)	4(8%)	8(16%)
Maturation arrest	0	1(2%)	4(8%)
Hypospermatogenesis	4(8%)	8(16%)	1(2%)
Tubular sclerosis	0	3(6%)	9(18%)

Figure legend:

Figure 1. ROC curve showing FSH levels in terms of presence of motile sperm in the specimen.



Título conciso: Espermatozóides móveis em azoospermia

Fatores preditivos da recuperação de espermatozóides móveis na biópsia testicular em pacientes com azoospermia não obstrutiva

Souza CAB,

Cunha Filho JS,

D Santos D,

Gratão A,

Freitas FM,

Passos EP,

*Setor de Reprodução Humana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência:

Setor de Reprodução Humana

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Carlos Augusto Bastos de Souza,

Rua Ramiro Barcelos, 2350/1135

90035-003 - Porto Alegre, RS - Brasil

Phone: +55-51-3316-8117

Fax: +55-51-3332-3523

E-mail: casouza@via-rs.net

Artigo publicado na International Urology and Nephrology 2003; 35:53-7.

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi de avaliar o valor preditivo dos níveis hormonais e análise histológica na recuperação de espermatozóides móveis na biópsia testicular em azoospermia não obstrutiva.

Métodos: Este estudo transversal avaliou os níveis do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante, prolactina e testosterona total em 50 pacientes submetidos à biópsia testicular previamente à ICSI. Foi considerado significativo um $P < 0.05$.

Resultados: A obtenção foi conseguida em 28 casos, e espermatozóides móveis foram obtidos em 7. Diferenças significativas foram detectadas entre a presença de espermatozóides móveis e ausência de espermatozóides quanto aos níveis de FSH ($P = 0.003$, ANOVA one-way). As outras variáveis não demonstraram diferenças significativas. A curva ROC mostrou que níveis de FSH abaixo de 17.00 IU/L eram preditores do achado de espermatozóides móveis.

Conclusões: Os valores de FSH podem servir como um fator preditivo para o achado de espermatozóides móveis na biópsia testicular de pacientes azoospérmicos. Por outro lado, a análise histológica e as outras dosagens hormonais não foram úteis em prever a recuperação de espermatozóides.

Palavras-chave: azoospermia / biópsia / infertilidade masculina / espermatozóides móveis / testículo

Introdução

A técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) tem sido utilizada no tratamento de várias formas de infertilidade masculina como oligozoospermia e azoospermia (1-3). Ainda que espermatozóides móveis e imóveis possam ser utilizados na ICSI, as taxas de fertilização e gestação são menores com espermatozóides imóveis (4).

Espermatozóides obtidos de pacientes azoospermicos são freqüentemente imóveis, sendo associados com piores resultados na ICSI. O processo de obtenção de espermatozóides nem sempre apresenta sucesso, especialmente em pacientes com azoospermia não obstrutivas; onde as taxas de falha podem chegar a 50% (5-6). Quando os espermatozóides não podem ser obtidos, a indução da ovulação é perdida (7). Além das altas taxas de falha na obtenção de espermatozóides, a biópsia testicular é associada com alterações na vascularização, desenvolvimento de hematomas e infecção (8). Devido a esses fatos, a busca de fatores preditivos do achado de espermatozóides em casos de azoospermia é uma necessidade.

Alguns pesquisadores recomendavam que altos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) fosse utilizado como marcador de espermatogênese inadequada (9-11). No entanto, outros autores não conseguiram identificar o FSH como um fator preditivo adequado do achado de espermatozóides (12). Outros marcadores, como inibina-B, análise histológica ou presença de espermátides na amostra, também têm sido testados, mas apresentam resultados contraditórios (5,6,13,14).

Apesar do grande número de estudos avaliando fatores preditivos para recuperação de espermatozóides, esses estudos avaliam espermatozóides em

geral. Há poucos dados sobre o valor preditivos desses achados para o achado específico de espermatozóides móveis na biópsia testicular de pacientes azoospérmicos.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o valor preditivo da dosagem hormonal, análise histológica, e volume testicular para a recuperação de espermatozóides móveis em casos de azoospermia não obstrutiva em pacientes submetidos à biópsia testicular.

Material e métodos

Delineamento

Foi realizado um estudo transversal no Setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período entre janeiro de 1998 e dezembro de 2001, em pacientes sendo tratados por infertilidade.

Pacientes

Foram estudados 50 pacientes com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva. Todos os pacientes foram informados do estudo e foi obtido consentimento escrito para participação no mesmo. O estudo foi aprovado pela comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n^o 028/98).

Dosagens hormonais

Os pacientes foram submetidos a dosagens hormonais de FSH, LH, prolactina e testosterona total na primeira de consulta. As amostras foram

centrifugadas a velocidade de 2500 rpm para separação do plasma e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. As dosagens de FSH, LH e prolactina foram analisadas utilizando quimioluminescência com kits comerciais (Immulite Ltda®, USA) e as dosagens de testosterona total utilizando radioimunoensaio com o kit comercial (INC®, Germany). As variações inter e intrakits foram 5,45 e 13,3% para prolactina, 2,8 e 4,2% para FSH, 2,6 e 3,8% para LH e 3,3 e 4,9% para testosterona total. Os kits não demonstraram reação cruzada significativa entre os hormônios avaliados.

Obtenção de espermatozoides

Os pacientes foram submetidos a biópsia testicular previamente ao ciclo de ICSI sob anestesia local com lidocaína 0,5% (10). Uma pequena incisão longitudinal escrotal foi realizada com exposição da túnica albugínea e visualização dos vasos subtúnicos. Duas ou três incisões foram realizadas na túnica albugínea em diferentes posições de cada testículo, evitando-se os vasos. Com secção tecidual e compressão testicular foi realizada extração do tecido testicular. As amostras foram divididas em quartis sendo o primeiro quarto colocado em solução de Bouin e enviado para análise histológica e restante colocado em uma placa de Petri e enviado imediatamente para o laboratório de biologia da reprodução situado na sala ao lado.

Processamento da amostra

As amostras foram processadas de forma similar àquela descrita por Silber *et al.* (1996). O tecido testicular foi colocado em uma placa de Petri contendo um mililitro de meio P1 (Irvine®), acrescido de 10% de SSS (Syntetic

Substitute Serum, Irvine®) e macerado com o auxílio de duas lâminas de bisturi. O fluido foi centrifugado a 1000 g. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 1 ml de meio (P1 + SSS). O mesmo volume de meio de congelação (Test Yolk Buffer, Irvine®) foi adicionado e o volume final acondicionado em palhetas de 0,5 ml. A congelação foi realizada expondo as palhetas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e transferindo-as para o nitrogênio líquido, onde ficaram armazenadas.

As amostras foram classificadas quanto ao achado de espermatozoides em três grupos: presença de espermatozoides móveis, presença de espermatozoides imóveis na amostra e ausência de espermatozoides na amostra. Foram realizadas em dois momentos uma primeira análise imediata e uma segunda vinte e quatro horas após incubação.

Análise histológica

A histologia foi realizada no laboratório de patologia do nosso serviço. A histologia foi classificada em cinco categorias: espermatogênese normal, hipoespermatogênese, síndrome de células de Sertoli, parada de maturação espermática e esclerose tubular. Foram considerados casos de hipoespermatogênese a presença de túbulos seminíferos contendo poucas espermátides e diminuição no número de espermatogônias e espermátócitos primários. O diagnóstico de síndrome células de Sertoli foi dado quando os túbulos seminíferos apresentavam apenas células de Sertoli. O diagnóstico de parada de maturação foi dado quando havia menos do que 17 espermatogônias por túbulo e menor número de espermátócitos primários com espermátides ausentes. O diagnóstico de esclerose tubular compreendeu os casos com

ausência de células germinativas e de células de Sertoli. Os patologistas não possuíam qualquer informação quanto às características do caso ou quanto ao resultado do achado de espermatozóides no laboratório de biologia da reprodução.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 9.0. As variáveis quantitativas foram analisadas utilizando análise de variância com um critério de classificação (ANOVA one-way) e o teste de Bonferroni utilizado para discriminar as diferenças. As variáveis categóricas foram avaliadas utilizando teste χ^2 e/ou teste exato de Fisher. Foram construídas curvas ROC para análise dos diferentes valores preditivos das variáveis quantitativas. Na curva ROC foi determinado o ponto com maior acurácia para o achado de espermatozóides móveis quando comparado com a ausência de espermatozóides na biópsia testicular. Foram considerados significativos $P < 0,05$.

Resultados

A amostra de pacientes consistiu de 50 pacientes. Os espermatozóides foram obtidos com sucesso em 28 (56%) pacientes, sendo obtidos espermatozóides móveis em 7 casos e imóveis em 21 casos na análise imediata. Na análise 24 horas após incubação, foram evidenciados 12 casos com espermatozóides móveis e 16 com espermatozóides imóveis.

A tabela 1 mostra os resultados de achado de espermatozóides na análise imediata das variáveis pesquisadas. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com presença de espermatozóides

e ausência de espermatozoides quanto aos valores de FSH ($P= 0,003$). A tabela 2 demonstra os resultados do achado de espermatozoides na análise 24 horas após a obtenção de espermatozoides. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de FSH quanto ao achado de espermatozoides móveis e a ausência de espermatozoides ($P=0.003$). As demais variáveis não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

A predição segundo os valores de FSH do achado de espermatozoides móveis na análise imediata foi calculada segundo uma curva ROC demonstrada na Figura 1. Segundo a avaliação da curva ROC o melhor valor de FSH como fator preditivo do achado de espermatozoides móveis para análise imediata foram valores abaixo de 17,00 UI/L - sensibilidade de 81,8 % e especificidade de 60,7 %. Na análise em 24 horas o ponto de corte encontrado foi um valor de FSH de 18,80 UI/L - sensibilidade de 72,7 % e especificidade de 65,3%. A tabela 3 descreve o achado de espermatozoides segundo o tipo histológico.

Discussão

Entre as variáveis analisadas no presente estudo, apenas o FSH demonstrou uma correlação significativa com a espermatogênese testicular – níveis abaixo de 17.00 IU/L tiveram um alto valor preditivo para o achado de espermatozoides móveis na análise imediata da biópsia de pacientes azoospermicos. E níveis abaixo de 18.80 IU/L tiveram um alto valor preditivo para o achado de espermatozoides móveis na análise 24 horas após a biópsia. Não houve correlação entre a recuperação de espermatozoides móveis e a análise histológica e os outros hormônios analisados (Tabela I). Nossos dados

estão em concordância com a afirmação que o FSH é capaz de predizer o achado de espermatozóides móveis em azoospermia não obstrutiva.

Outros pesquisadores têm demonstrado a associação entre níveis de FSH e o nível de patologia testicular (11). Em um estudo com 86 pacientes com azoospermia não obstrutiva, o grupo com menores níveis de FSH apresentou maior probabilidade de recuperação de espermatozóides (15). Estes dados são similares com a observação que a taxa de obtenção de espermatozóide foi inversamente proporcional aos níveis de FSH (12).

Em alguns estudos, espermatozóides foram recuperados em muitos pacientes apesar dos seus altos níveis de FSH (6,11,12,15). Isto sugere que pacientes com altos níveis de FSH, ainda assim, podem apresentar algum grau de espermatogênese (15). Ainda que esses estudos indiquem uma correlação entre níveis de FSH e espermatogênese, eles não avaliam o valor preditivo do FSH para a presença de espermatozóides móveis, que são mais adequados para a ICSI.

Com o objetivo de aumentar o poder diagnóstico do FSH, alguns autores sugerem a correlação do FSH e inibina para a avaliação de pacientes azoospérmicos (14). Demonstraram que a acurácia do volume testicular e FSH foi similar – aproximadamente de 70% para o sucesso do achado de espermatozóides para fertilização *in vitro* – e colocaram que o uso da inibina B como um indicador de espermatogênese deveria ser encorajado, pois aumentava a acurácia diagnóstica (94.1%). Em nosso estudo, os níveis de inibina B não foram incluídos na análise hormonal, pois os valores dessa dosagem não estavam validados no início do estudo em 1998. Porém, apesar dos achados positivos, outros autores têm relatado resultados desfavoráveis da

inibina B (14). A inibina B tem sido apresentada como uma melhor ferramenta para determinação da espermatogênese, porém não têm conseguido demonstrar ser um fator preditivo acurado para a recuperação de espermatozóides testiculares (13).

Um grande número de pacientes azoospermicos apresenta apenas espermatozóides imóveis; este fato foi confirmado por nossos achados (7 móveis *contra versus* 21 imóveis na análise imediata e 12 *versus* 16 na análise em 24 horas). Espermatozóides imóveis tem sido associados com menores taxas de fertilização e gestação na ICSI quando comparado com uso de espermatozóides móveis, ainda que alguns autores não tenham encontrado diferença no número de embriões e no potencial de inseminação (16).

Além disso, quando espermatozóides imóveis são usados na ICSI, a avaliação da vitalidade espermática é prejudicada, pois outros parâmetros que não a motilidade devem ser analisados. Apesar do desenvolvimento de testes hiposmóticos que não são tóxicos ao espermatozóide, e de outros como o comprimento cabeça-cauda, todos envolvem manipulação do espermatozóide que está associada a lesões na membrana plasmática e diminuição na capacidade fertilizante (17). Assim, o achado de espermatozóides móveis no tecido testicular de pacientes azoospermicos é extremamente importante para o sucesso da ICSI. A maior parte dos estudos não avalia a pesquisa por espermatozóides móveis, porque independente do tipo de espermatozóide encontrado, este será utilizado na ICSI. No entanto, a informação de fatores preditivos é importante para a orientação dos pacientes com azoospermia não obstrutiva previamente a realização da biópsia testicular.

As outras dosagens hormonais (LH, prolactina e testosterona total) não foram úteis na predição de espermatozóides móveis. Estes dados são compatíveis com o conhecimento da fisiologia destes hormônios. São utilizados no diagnóstico de outras patologias que podem modificar o tratamento da infertilidade e não conseguem avaliar a espermatogênese testicular.

Nós não encontramos diferenças significativas entre os achado histológicos e os resultados de recuperação de espermatozóides. Variáveis histológicas não são adequadas para prever a obtenção de espermatozóides, pois são válidas apenas para pacientes que já tenham sido submetidos a um procedimento prévio, e a ausência de espermatozóides em uma biópsia prévia não determina que a próxima biópsia não terá sucesso em obtê-los (12).

Sendo assim, os níveis de FSH podem servir como um fator preditivo do achado de espermatozóides móveis na biópsia testicular de pacientes azoospermicos. Em nossa população, os níveis de FSH abaixo de 17.00 IU/L foram associados ao achado de espermatozóides móveis. Por outro lado, a análise histológica, volume testicular e outras dosagens hormonais não foram úteis na predição de espermatozóides móveis. Nós sugerimos que outros estudos sejam realizados para avaliar a contribuição de outros marcadores como a Inibina B, fator antimülleriano para o valor preditivo do FSH para o achado de espermatozóides móveis em azoospermia.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio recebido do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Agradecemos também o apoio do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Referências

1. Franco Jr. JG, Petersen CG, Mauri AL et al. Tratamento do fator masculino grave em infertilidade pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides – Primeiras gestações obtidas com a coleta de espermatozoides do testículo. *RBGO* 1995; 17: 967-76.
2. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62: 639-641.
3. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Nagy Z et al. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66: 331-334.
4. Nagy ZP, Joris H, Verheyen G et al. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 890-895.
5. Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D et al. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 1997; 49: 91-97.
6. Ezeh UIO, Moore HDM, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* 1998; 13: 3066-3074.

7. Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R 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: 1794-1801.
8. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-1692.
9. Hargreave TB, Jequier AM. Can follicle stimulating hormone estimation replace testicular biopsy in the diagnosis of obstructive azoospermia? *Br J Urol* 1978; 50: 415-418.
10. Westlander G, Hamberger L, Hanson C et al. Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 118-122.
11. Yaman O, Ozdiler E, Seckiner I et al. Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nephrol* 1999; 31: 519-523.
12. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-86.
13. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M 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: 2496-2501.
4. Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1734-1738.

15. Cha KY, Oum KB, Kim HJ. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 985-995.
16. Shulman A, Feldman B, Madgar I et al. In-vitro fertilization treatment for severe male factor: fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. *Hum Reprod* 1999; 14: 749-752.
17. Marmar JL, Corson SL, Gibbs M et al. Tail to head ratio of fresh and frozen testicular sperm as measure of viability. *J Androl* 1998; 19: 58.

Tabela 1. Correlação entre as características espermáticas e as variáveis estudadas imediatamente após a biópsia.

	Espermatozóides móveis (n=7)	Espermatozóides imóveis (n=21)	Ausentes (n=22)	<i>P</i>
FSH (IU/L)	14,60 ^a (±5,97)	18,66 ^a (±6,98)	25,71 ^a (±9,628)	0,003 ^b
Hormônio luteinizante (IU/L)	8,15 (±4,84)	10,94 (±6,24)	14,82 (±10,20)	0,115 ^b
Prolactina (ng/ml)	6,34 (±1,74)	8,39 (±3,04)	7,93 (±3,09)	0,324 ^b
Testosterona (ng/ml)	3,08 (±0,16)	3,92(±0,56)	4,33 (±1,02)	0,140 ^b

FSH: Hormônio folículo estimulante

^a Significante

^b ANOVA One-way

Tabela 2. Correlação entre as características espermáticas e as variáveis estudadas imediatamente 24 horas após a biópsia.

	Espermatozóides móveis (n=12)	Espermatozóides imóveis (n=16)	Ausentes (n=21)	<i>P</i>
FSH (IU/L)	13,77 ^a (±4,64)	20,55 (±6,93)	25,71 ^a (±9,628)	0,0001 ^b .
Hormônio luteinizante (IU/L)	8,36 (±4,54)	11,65 (±6,62)	14,82 (±10,20)	0,089 ^b .
Prolactina (ng/ml)	7,12 (±2,35)	8,45 (±3,57)	7,93 (±3,09)	0,545 ^b .
Testosterona (ng/ml)	3,83 (±0,40)	3,94(±0,56)	4,33 (±1,02)	0,140 ^b .

FSH: Hormônio folículo estimulante

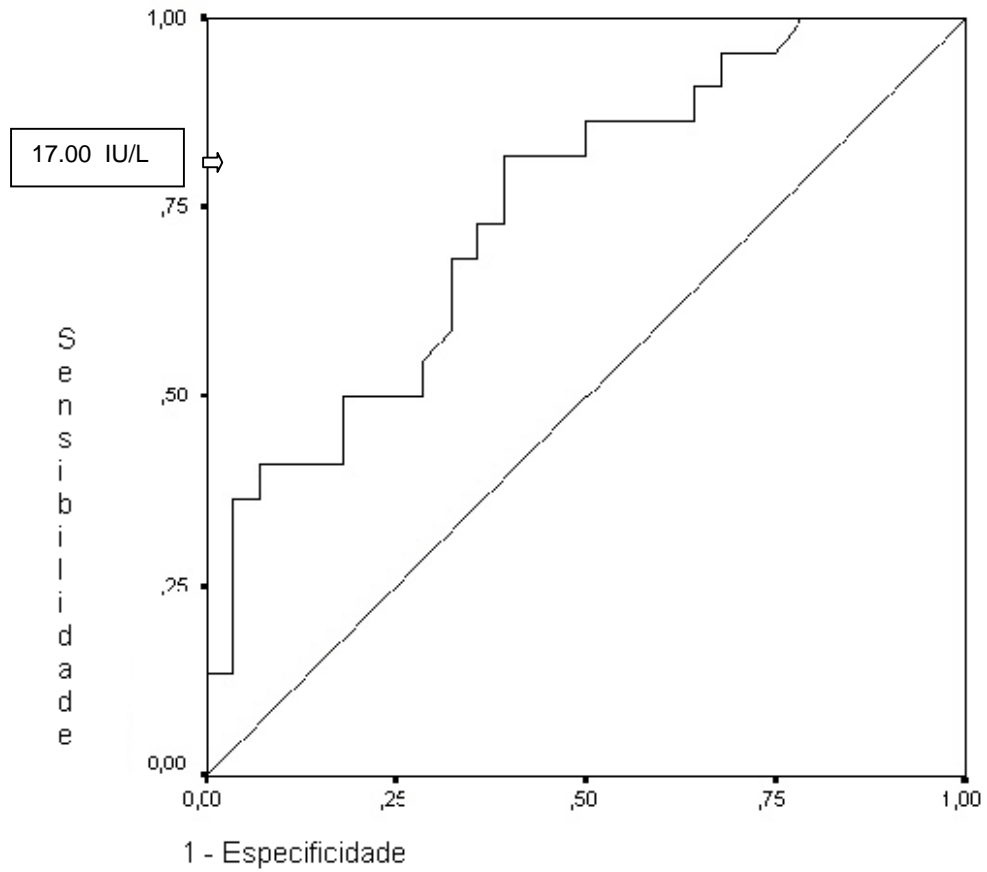
^a Significante

^b ANOVA One-way

Tabela 3. Diagnósticos histológicos em relação à recuperação de espermatozóides.

	Espermatozóides móveis (n=7)	Espermatozóides imóveis (n=21)	Ausência de espermatozóides (n=22)
Espermatogênese	1 (2%)	5 (10%)	0
Síndrome de células de Sertoli	2 (4%)	4 (8%)	8 (16%)
Parada de maturação	0	1 (2%)	4 (8%)
Hipoespermatogênese	4 (8%)	8 (16%)	1 (2%)
Esclerose tubular	0	3 (6%)	9 (18%)

Figura 1. Curva ROC mostrando os níveis de FSH em relação a presença de espermatozoides móveis na amostra.



Sperm recovery prediction in azoospermic patients using Doppler ultrasonography

Souza CAB, MD ¹

Cunha-Filho JSL, MD, PhD ¹

Fagundes P, MD ²

Freitas FM, MD, PhD ¹

Passos EP, MD, PhD ^{1,2}

1 Human Reproduction Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2. Serviço de Ecografia e Genética, Porto Alegre, Brazil

Mail to:

Human Reproduction Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Carlos Augusto Bastos de Souza, MD

Rua Ramiro Barcelos, 2350 / 1135

90035-003 - Porto Alegre, RS - Brazil

Phone: +55-51-3316-8117

Fax: +55-51-3332-3523

E-mail: casouza@via-rs.net

Running head: Doppler ultrasonography and azoospermia

Submitted to Journal of Assisted Reproduction and Genetics

Capsule

Power Doppler ultrasonography can be used to predict sperm recovery in azoospermic patients

Abstract

Purpose: To evaluate power Doppler ultrasonography to predict sperm recovery in azoospermic patients.

Methods: Colour Doppler and power Doppler ultrasonography of testis were performed in 38 patients before testicular sperm extraction. Analysis of blood flow included the pulsatility and resistance index of intratesticular vessels and testicular artery, and power Doppler of testis. The results of power Doppler of testis were classified into 3 categories: 0, no vessels found; 1, one to three vessels; 2, more than three vessels found.

Results: Power Doppler of both testis showed a significant difference between obstructive azoospermia and non-obstructive azoospermia (Fisher's exact test - $P=0.02$), and between the groups with and without sperm recovery (Fisher's exact test - $P=0.001$). Doppler indices of intratesticular vessels and testicular artery were similar between the groups.

Conclusions: Testicular Power Doppler assessment showed that patients with obstructive azoospermia have better blood flow than patients with non-obstructive azoospermia, and power Doppler is able to predict sperm recovery in azoospermic patients.

Key words: azoospermia/ colour Doppler/ testicular sperm extraction / ultrasonography

Introduction

Azoospermia is an important diagnosis at infertility centers. It is classically divided into obstructive and non-obstructive azoospermia. Patients with non-obstructive azoospermia have primary testicular failure. The testicular structure in non-obstructive azoospermia is severely altered and some authors have demonstrated that testicular blood flow is also strongly modified showing decreased or absent intratesticular arterial flow. On the other hand, patients with obstructive azoospermia usually have normal spermatogenesis and normal testicular structure and blood flow. (1,2)

Azoospermic patients are treated with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) associated to testicular sperm extraction. (3) Several times patients with azoospermia are submitted to multiple procedures for sperm retrieval. The sperm recovery rate is different between obstructive and non-obstructive azoospermia. Several clinical, seminal, hormonal, and sonography parameters are unable to predict an accurate diagnosis of testicular recovery prior to testicular biopsy. (4) (5)

Power Doppler ultrasonography has arrived as a new evaluation method for microvasculature, and, consequently, for testicular blood flow. (5,6) Authors have tried to associate spermatogenesis with Doppler evaluation of intratesticular vascularization. (7,8) Others associated testicular blood flow assessed by power Doppler with testicular sperm retrieval. (1) Associating testicular microvascularization with spermatogenesis focus could help to diagnosis the clinical presentation of azoospermic patients before testicular biopsy. This investigation has been conducted to evaluate whether power Doppler

ultrasonography is a suitable tool to predict sperm recovery in azoospermic patients.

Materials and methods

Design

A cross-sectional study was conducted at the Human Reproduction Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, between January 2002 and December 2003.

Patients

Thirty-eight azoospermic patients were included in the study. Sixteen of these patients were obstructive and 22 of them were non obstructive. Written informed consent was obtained from all patients included in the study. The protocol was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (271/2002).

Ultrasonography

The patients were submitted to color Doppler ultrasonography and power Doppler ultrasonography one week before testicular biopsy. The ultrasonography was performed using a 7.5 MHz multifrequencies probe (SONOACE 9900 – MEDISON KOREA). A 50 Hz filter was used, the maximum ultrasonographic energy was $<80 \text{ mW/cm}^2$. All patients were studied between 08:00 and 11:00 am and they rested for at least 15 min before the ultrasonography. All the exams were done by the same researcher (CABS) and reevaluated by another

researcher (PF). We have calculated a κ between the researcher (P 0.901). Analysis of blood flow included the pulsatility index (PI) and resistance index (RI) of intratesticular vessels (ITV) and testicular artery (TA), and power Doppler of testis. The results of power Doppler of testis were classified into 3 categories (0,1,2) – category 0, no vessels found; category 1, between one and three vessels; category 2, more than three vessels found (1).

Hormonal analysis

Patients were submitted to laboratory exams to assess levels of FSH, luteinizing hormone, prolactin, and total testosterone in the first visit for diagnostic evaluation, as previously described (9). Samples were centrifuged at 2500 rpm for separation of plasma and frozen at -20 °C for later analysis. FSH, luteinizing hormone, and prolactin were analyzed with chemoluminescence kits (Immulite, Los Angeles, CA); testosterone level was assessed by means of radioimmunoassay (ICN , Germany). Inter- and intrakit variations were 5.45 and 13.3%, respectively, for prolactin; 2.8 and 4.2% for FSH; 2.6 and 3.8% for luteinizing hormone; and 3.3 and 4.9% for total testosterone. The kits did not show significant cross-reaction between the hormones evaluated.

Testicular biopsy

Patients were submitted to testicular biopsy prior to the ICSI cycle, and one week after ultrasonography. A small longitudinal scrotal incision was performed to expose the tunica albuginea and to allow visualization of the vessels underneath it. Two or three incisions were made in the tunica albuginea

at different positions in each testicle, avoiding injury to the vessels and extracting testicular tissue. The samples were extracted in a random fashion and divided into quartiles. The first quartile was sent to histological analysis. The remaining specimens were placed in a Petri dish and immediately sent to the adjacent reproduction biology laboratory.

Specimen processing

Specimens were processed as previously described. Testicular tissue was placed in a Petri dish containing 1 ml of P1 medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) and 10% synthetic serum substitute (SSS) (Test Yolk Buffer, Irvine Scientific). The tissue was macerated, and the resulting fluid was centrifuged at 1000 x g. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1 ml of medium (P1 + SSS). Samples were frozen by exposure of the pellets to nitrogen vapor (-120 °C) for 20 minutes and transferred to liquid nitrogen for storage. Two categories were then defined: presence or sperm.

Histological analysis

Histological analysis was performed at the pathology laboratory in our Service. The histological findings were divided into five categories: 1) normal spermatogenesis, 2) hypospermatogenesis, 3) Sertoli cell-only syndrome, 4) sperm maturation arrest, and 5) tubular sclerosis (5).

Hypospermatogenesis was defined as the presence of seminiferous tubules containing few spermatids and a decreased number of spermatogonia and primary spermatocytes. Sertoli cell-only syndrome was diagnosed when the seminiferous tubules presented only Sertoli cells. Sperm maturation arrest was

defined in the presence of fewer than 17 spermatogonia in each tubule and a lower number of primary spermatocytes, with absence of spermatids. Tubular sclerosis included cases with absence of germ cells and Sertoli cells. The pathologists responsible for making these diagnoses were blinded to patient characteristics and spermatozoa recovery results.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the SPSS 12.0 software. Quantitative variables were compared using Student's t test and Mann-Whitney test. Fisher's exact test was used to compare categorical data. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Our sample included 16 cases of obstructive azoospermia and 22 of non-obstructive. Table I shows the characteristics of the sample. We were able to find spermatogenesis focus in 16 (100%) patients with obstructive azoospermia, and 8 (64%) patients with non-obstructive azoospermia. Serum FSH levels were significantly different between groups of patients with positive and negative sperm recovery ($P = 0.034$ – Mann Whitney test).

The Doppler indices (PI and RI) of ITV and TA were similar between the right and left testis, and there were no significant differences between the groups with and without sperm recovery (Table II). The power Doppler of both testis showed a significant difference between obstructive azoospermia and non obstructive azoospermia (Fisher's exact test – $P = 0.02$), and between the groups

with and without sperm recovery (Fisher's exact test – $P=0.001$) (Figure 1). Table III shows the spermatozoa recovery according to histological findings.

Analyzing sperm recovery in non-obstructive azoospermic patients, we found a difference in power Doppler indices between the groups with and without spermatozoa in testicular biopsy (Fisher's exact test – $P=0.006$) (Figure 2), and we calculated the Spearman indice and found a correlation of 62%. Sensitivity power Doppler to success in sperm recovery was of 100 % and specificity was of 35%.

Discussion

Our data show that testicular microvascularization evaluated by Power Doppler ultrasonography is able to differentiate obstructive and non-obstructive azoospermia. Indeed, we were able to demonstrate that power Doppler is able to predict sperm recovery in testicular biopsy. Thus, Power Doppler technology can be used as a valuable tool in the evaluation of azoospermic patients.

These patients are usually treated with ICSI and methods to obtain sperm; these methods are aggressive and several tools to predict sperm recovery have been studied (3,4). An appropriate differentiation between obstructive and non-obstructive azoospermia is important, therefore, because the adequate diagnosis will improve medical prognosis and orientation to patients (2).

Patients with obstructive azoospermia have the testicular parenquima architecture and function preserved. These patients are able to produce spermatozoa and only face problems with sperm transport. Obstructive azoospermia is compatible with a normal testicular microvascularization (6,9). However, patients with non-obstructive azoospermia have an altered testicular

structure, so the testicular microvascularization is strongly modified. These characteristics have been confirmed by our study and showed by others (6). The study of testicular vascularization tries to associate better blood flow with testicular function (1,10). We demonstrated that patients with better microvascularization have a higher probability of having spermatogenesis. Testicular regions with uniform and normal microvascularization are supposed to have an association with testicular function and spermatogenesis focus (11,12).

We did not find alterations in the testicular blood flow evaluated using only colour Doppler. In the evaluation of systems with low blood flow as the testis, the microvascularity evaluation can usually only be done with the association of PD and colour Doppler (13). Colour Doppler alone is not able to evaluate testicular blood flow (6,11,12,14).

Others authors have demonstrated that color Doppler flow measurements of intratesticular transmediastinal arteries are able to differentiate obstructive and non-obstructive azoospermic patients (5). Patients with non-obstructive azoospermia had higher resistances. In our series, we did not find this difference. Our findings are in consonance with those of authors that concluded that there is a difference between the two groups' parenchyma, but this difference cannot be demonstrated using color Doppler isolatedly. Still other authors using a complex study system of testicular vascularization, also demonstrated that testicular areas with better vascularization have more potential of spermatogenesis. However, this system is complex and hard to implement and we believe a diagnostic tool must be accessible, simplex and fast (8).

The search for predictive factors to sperm recovery in azoospermia has improved in the last two decades. Several researchers had tried to define a

simplex marker. Initially, the studies had started with FSH. The FSH' findings were positive, but not definitive, because a great number of false positives and negative cases (5,9). Then, Inhibin B has appeared as a potential predictive factor to sperm recovery. The initial data had showed Inhibin B as an exam able to demonstrated testicular function and testicular spermatogenesis focus. Some data were compatible with sperm predictive factors, however others authors had showed that in some patients with altered Inhibin B levels they were able to found spermatozoa. These controversial results probably demonstrate the studies heterogeneous (11).

Patients with non-obstructive azoospermia are the group that would have more benefit on the development of a predictive factor to sperm recovery. We have found a significant difference in the power Doppler indices in the prediction of sperm in testicular biopsy. Our data are similar to the other authors (1,6,7). Patients with non-obstructive azoospermia have an altered testicular microvascularization. We have shown that the patients with great alterations in testicular blood flow don't have spermatozoa in testicular biopsy. The power Doppler showed a great ability as a marker to patients that would not be candidate to testicular sperm recovery procedure.

Patients with obstructive azoospermia have a high probability of success in sperm recovery. These patients always should be orientated to testicular biopsy or needle aspiration. On other hand, patients with non-obstructive azoospermia are the group that the Power Doppler will be more advantageous. The exam will help to predict testicular function and sperm recovery. In conclusion, testicular Power Doppler assessment showed that patients with obstructive azoospermia have better blood flow than patients with non-obstructive

azoospermia and, thus that exam can make diagnosis distinguishing one group from other. Besides, power Doppler ultrasonography is able to predict sperm recovery in testicular biopsy. Power Doppler effect demonstrated that patients with non-obstructive azoospermia have worse microvascularization than the ones with obstructive azoospermia.

References

1. Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998; 13: 3090-3093.
2. 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: 1974-1979.
3. Silber SJ, Steirteghem AC, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66: 110-117.
4. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-1692.
5. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Gossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-86.
6. Battaglia C, Giulini S, Regnani G, Madgar I, Facchinetti F, Volpe A. Intratesticular Doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates, and nonobstructive

sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 2001; 75: 1088-1094.

7. Ergun S, Stingl J, Holstein AF. Segmental angioarchitecture of testicular lobule in man. *Andrologia* 1994; 26: 143-150.

8. Eytan O, Har-Toov J, Fait G, Yavetz H, Hauser R, Yogev L, Botchan A, Bem-Yosef D, Elad D, Jaffa A. Vascularity index distribution within the testis: a technique for guiding testicular sperm extraction. *Ultrasound in Med & Biol* 2001; 27: 1171-1176.

9 Souza CAB, Cunha Filho JS, Santos D, Gratão A, Freitas FM, Passos EP. Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in nonobstructive azoospermic patients. *Int Urol Nephrol* 2003; 35: 53-7.

10. Ezeh Ui, Moore HD, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13: 3075-3080.

11. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Lycke N, Nilsson L, Werner C, Bergh C. Serial ultrasonography, hormonal profile and antisperm antibody response after testicular sperm aspiration. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 2621-2627.

12. Souza CAB, Fagundes P, Cunha F^o JSL, Freitas F; Passos EP. Power Doppler Ultrasonography in non-obstructive and obstructive azoospermia. In: 19 annual meeting of the ESHRE, 2003, Madrid. *Human Reproduction*. Londres: Oxford University Press, 2003. v. 18, p. 197-198.

13. Passos EP, Fagundes P, Cunha F^o JSL, Freitas F, Souza CAB. Serial Power Doppler Ultrasonography after testicular sperm extraction. In: 19 annual meeting of the ESHRE, Madrid. *Human Reproduction*. Londres: Oxford University Press, 2003. v. 18, p. 202.

14. Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL, Adler RS. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiol* 1994; 190: 853-6.

15 Har-Toov J, Fait G, Houser R, Wolman I, Yavez H, Jaffa A. Can Doppler ultrasonographic measurements of the testis predict spermatozoa retrieval in azoospermic patients undergoing testicular biopsy? *Fertil Steril* 2001; 76: 1276-1277.

Table I. Distribution of characters of the obstructive and non-obstructive azoospermic patients (mean \pm SD)

	Obstructive (n=16)	Non obstructive (n=22)	<i>P</i> *
Age	35.27 \pm 6.42	34.39 \pm 4.51	0,661
FSH	5.11 \pm 1.57	15.3 \pm 5.13	0,001
LH	3.54 \pm 1.31	4.60 \pm 1.77	0,102
Testosterone	4.44 \pm 1.60	4.26 \pm 1.87	0,181
Prolactin	7.01 \pm 4.44	8.51 \pm 4.79	0,802

*Student's t test

Table II. Distribution of ITV intratesticular vessels and testicular arteries indices between patients with and without spermatozoa in testicular biopsy (median, CI)

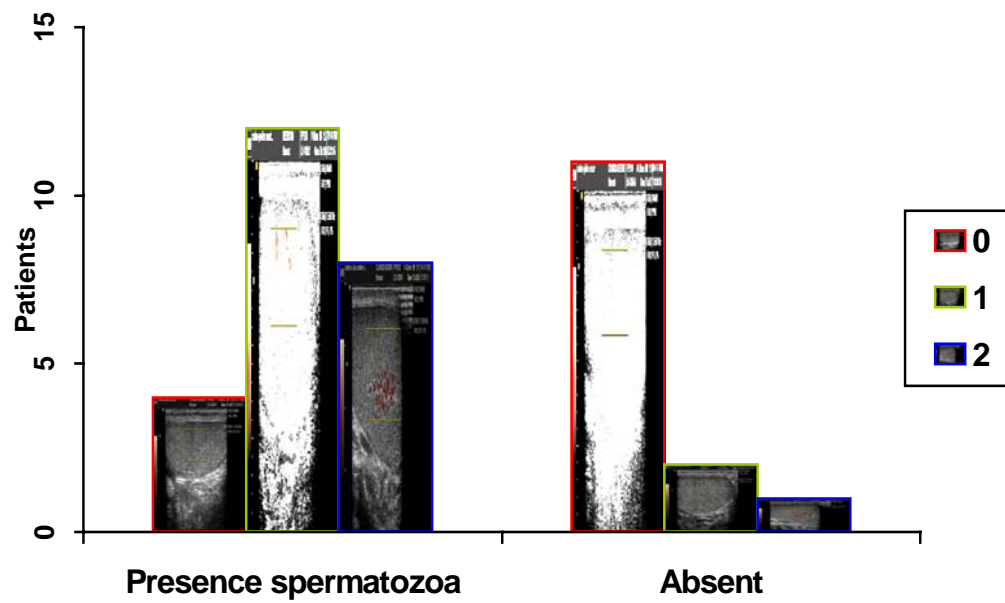
Testicular index	Presence spermatozoa n=24	Absent n=14	<i>P</i>
Pulsatility index ITV	0.91 (0.82 - 1.15)	1.15 (0.92 – 1.68)	0.11
Resistance index ITV	0.60 (0.54 - 0.68)	0.66 (0.59 – 0.73)	0.19
Pulsatility index TA	1.61 (1.41 – 2.03)	1.64 (1.38 – 2,12)	0.47
Resistance index TA	0.81 (0.69 - 0.86)	0.86 (0.71 – 1.06)	0.38

(Mann Whitney test)

Table III. Histological diagnoses according to sperm recovery findings

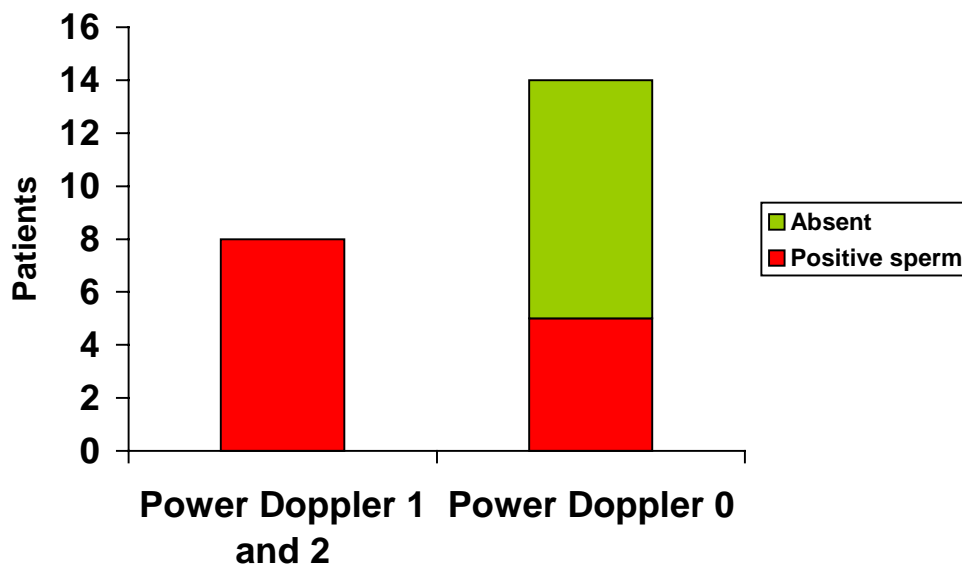
	Presence spermatozoa n=24	Absent n=14
Spermatogenesis	5 (13,2%)	0
Maturation arrest	4 (10,5%)	8 (21,1%)
Hypospermatogenesis	12 (31,5%)	0
Sertoli cell-only syndrome	3 (7,9%)	3 (7,9%)
Tubular sclerosis	0	3 (7,9%)

Figure 1. Distribution of power Doppler indices according to sperm recovery findings



Fisher's exact test – $P < 0.05$

Figure 2. Distribution of power Doppler indices in relation to sperm recovery in non-obstructive azoospermic patients.



Fisher's test $P= 0.006$

**Predição da recuperação de espermatozóides em pacientes azoospérmicos
utilizando a ultra-sonografia com Doppler**

Souza CAB, ¹

Fagundes P, ²

Cunha-Filho JSL, ^{1,2}

Freitas FM, ¹

Passos EP, ^{1,2}

1. Setor de Reprodução Humana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

2. Serviço de Ecografia e Genética, Porto Alegre, Brasil

Endereço para correspondência:

Setor de Reprodução Humana

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Carlos Augusto Bastos de Souza

Rua Ramiro Barcelos, 2350 / 1135

90035-003 - Porto Alegre, RS - Brasil

Phone: +55-51-3316-8117

Fax: +55-51-3332-3523

E-mail: casouza@via-rs.net

Título conciso: Ultra-sonografia Doppler e azoospermia

Cápsula

A ultra-sonografia com “power” Doppler pode ser utilizada para prever a recuperação de espermatozoides em pacientes azoospermicos.

Resumo

Objetivo: Avaliar a ultra-sonografia com “power” Doppler na predição do achado de espermatozóides em pacientes azoospérmicos.

Métodos: Foram realizadas ultra-sonografia com Doppler colorido e “power” Doppler dos testículos de 38 pacientes azoospérmicos antes da biópsia de testículo. A análise do fluxo sanguíneo incluiu aferição dos índices de pulsatilidade e resistência dos vasos intratesticulares, e “power” Doppler dos testículos. Os resultados do “power” Doppler dos testículos foram classificados em 3 categorias: 0, sem vasos encontrados; 1, um a três vasos; 2, mais do que três vasos encontrados.

Resultados: O “power” Doppler dos testículos mostrou uma diferença significativa entre os pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (Teste exato de Fisher – $P=0,02$), e entre os grupos com presença e ausência de espermatozóides na biópsia testicular (Teste exato de Fisher – $P=0,001$). Os índices de Doppler dos vasos intratesticulares e artérias testiculares foram similares entre os grupos.

Conclusões: A avaliação testicular com “power” Doppler demonstrou que pacientes com azoospermia obstrutiva possuem melhor vascularização que pacientes com azoospermia não obstrutiva, e que o “power” Doppler é capaz de prever a recuperação de espermatozóides em pacientes azoospérmicos.

Palavras chave: azoospermia/ biópsia testicular/ Doppler colorido/ ultra-sonografia

Introdução

A azoospermia é um importante diagnóstico em centros de infertilidade. É classicamente dividida em azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. Pacientes com azoospermia não obstrutiva possuem falência testicular primária. A estrutura testicular na azoospermia não obstrutiva é gravemente alterada e alguns autores têm demonstrado que a vascularização testicular também é fortemente modificada demonstrando diminuição ou ausência de fluxo intratesticular. Por outro lado, pacientes com azoospermia obstrutiva usualmente possuem espermatogênese normal, bem como estrutura testicular e fluxo sanguíneo (1,2).

Pacientes azoospérmicos são tratados com microinjeção de espermatozoides testiculares (ICSI) associada à extração de espermatozoides testiculares (3). Frequentemente, pacientes com azoospermia são submetidos a múltiplos procedimentos para obtenção de espermatozoides. A taxa de recuperação de espermatozoides é diferente entre azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. Vários parâmetros clínicos, seminais, hormonais e sonográficos não são capazes de prever um diagnóstico acurado da recuperação de espermatozoides antes da biópsia testicular (4, 5).

A ultra-sonografia com “power” Doppler tem surgido como um novo método para avaliar microvascularização e, desta forma, a vascularização testicular (5,6). Alguns autores têm tentado associar espermatogênese com avaliação da vascularização intratesticular (7,8). Outros associaram o fluxo sanguíneo testicular avaliado por “power” Doppler com a recuperação de espermatozoides testiculares (1). A associação da microvascularização testicular com os focos de espermatogênese poderia auxiliar no diagnóstico clínico de

pacientes azoospérmicos previamente a biópsia testicular. Este estudo foi conduzido para avaliar se a ultra-sonografia com “power” Doppler é uma ferramenta útil na predição de espermatozóides testiculares em pacientes azoospérmicos.

Material e métodos

Delineamento

Um estudo transversal foi realizado no Setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, entre janeiro de 2002 e dezembro de 2003.

Pacientes

Trinta e oito pacientes com azoospermia foram incluídos no estudo. Dezesesseis pacientes apresentavam azoospermia obstrutiva e 22 não obstrutiva. Consentimento informado foi obtido de todos os pacientes incluídos no estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil (271/2002).

Ultra-sonografia

Os pacientes foram submetidos a ultra-sonografia com Doppler colorido e a “power” Doppler uma semana antes da biópsia testicular. A ultra-sonografia foi realizada utilizando um transdutor de 7.5 MHz (SONOACE 9900 – MEDISON KOREA). Foram utilizadas as seguintes configurações: filtro 50 Hz, máxima energia sonográfica $<80 \text{ mW/cm}^2$. Todos os pacientes foram estudados entre

08:00 e 11:00 e permaneceram em repouso por pelo menos 15 min antes do exame. Todos os exames foram realizados pelo mesmo examinador (CABS) e reavaliados por outro (PF). Foi calculado um κ da concordância entre examinadores (P 0,901). A análise do fluxo sanguíneo incluiu: índices de pulsatilidade (IP) e resistência (IR) dos vasos intratesticulares (VIT) e artérias testiculares (AT), e “power” Doppler dos testículos. Os resultados foram classificados em 3 categorias (0,1,2) – 0, sem vasos encontrados; 1, um a três vasos; 2, mais do que três vasos encontrados (1).

Dosagens hormonais

Os pacientes foram submetidos a dosagens séricas de FSH, LH, prolactina e testosterona total na primeira de consulta, como descrito previamente (9). As amostras foram centrifugadas a velocidade de 2500 rpm para separação do plasma e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. As dosagens de FSH, LH e prolactina foram analisadas utilizando quimioluminescência com kits comerciais (Immulite Ltda®, USA) e as dosagens de testosterona total utilizando radioimunoensaio com o kit comercial (INC®, Germany). As variações inter e intrakits foram 5,45 e 13,3% para prolactina, 2,8 e 4,2% para FSH, 2,6 e 3,8% para LH e 3,3 e 4,9% para testosterona total. Os kits não demonstraram reação cruzada significativa entre os hormônios avaliados.

Obtenção de espermatozoides

Os pacientes foram submetidos a biópsia testicular uma semana após a ultra-sonografia e previamente ao ciclo de ICSI sob anestesia local com lidocaína

0,5% (10). Uma pequena incisão longitudinal escrotal foi realizada com exposição da túnica albugínea e visualização dos vasos subtúnicos. Duas ou três incisões foram realizadas na túnica albugínea em diferentes posições de cada testículo, evitando-se os vasos. Com secção tecidual e compressão testicular foi realizada extração do tecido testicular. As amostras foram divididas em quartis sendo o primeiro quarto colocado em solução de Bouin e enviado para análise histológica e restante colocado em uma placa de Petri e enviado imediatamente para o laboratório de biologia da reprodução situado na sala ao lado.

Processamento da amostra

As amostras foram processadas de forma similar à descrita previamente (9). O tecido testicular foi colocado em uma placa de Petri contendo um mililitro de meio P1 (Irvine®), acrescido de 10% de SSS (Syntetic Substitute Serum, Irvine®) e macerado com o auxílio de duas lâminas de bisturi. O fluido foi centrifugado a 1000 g. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido em 1 ml de meio (P1 + SSS). O mesmo volume de meio de congelação (Test Yolk Buffer, Irvine®) foi adicionado e o volume final acondicionado em palhetas de 0,5 ml. A congelação foi realizada expondo as palhetas ao vapor de nitrogênio (-120°C) por 20 minutos e transferindo-as para o nitrogênio líquido, onde ficaram armazenadas.

As amostras foram classificadas quanto ao achado de espermatozóides em três grupos: presença de espermatozóides móveis, presença de espermatozóides imóveis na amostra e ausência de espermatozóides na

amostra. Foram definidas duas categorias: presença ou ausência de espermatozóides.

Análise histológica

A histologia foi realizada no laboratório de patologia do nosso serviço. A histologia foi classificada em cinco categorias: espermatogênese normal, hipoespermatogênese, síndrome de células de Sertoli, parada de maturação espermiática e esclerose tubular (5). Foram considerados casos de hipoespermatogênese a presença de túbulos seminíferos contendo poucas espermatídes e diminuição no número de espermatogônias e espermatócitos primários. O diagnóstico de síndrome células de Sertoli foi dado quando os túbulos seminíferos apresentavam apenas células de Sertoli. O diagnóstico de parada de maturação foi dado quando havia menos do que 17 espermatogônias por túbulo e menor número de espermatócitos primários com espermatídes ausentes. O diagnóstico de esclerose tubular compreendeu os casos com ausência de células germinativas e de células de Sertoli. Os patologistas não possuíam qualquer informação quanto às características do caso ou quanto ao resultado do achado de espermatozóides no laboratório de biologia da reprodução.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 12.0. As variáveis quantitativas foram comparadas utilizando o teste t e o teste de Mann-Whitney. O teste exato de Fisher foi utilizado na avaliação das variáveis categóricas. Foi considerado significativo um $P < 0.05$.

Resultados

Nossa amostra incluiu 16 casos de azoospermia obstrutiva e 22 casos de não obstrutiva. A Tabela I mostra as características da amostra. Nós fomos capazes de encontrar focos de espermatogênese em 16 (100%) pacientes com azoospermia obstrutiva, e em 8 (64%) pacientes com azoospermia não obstrutiva. A diferença nos níveis de FSH foi estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com achado positivo e negativo de recuperação espermática ($P=0,034$ – Teste de Mann Whitney).

Os índices do Doppler (IP e IR) dos VIT e AT foram similares entre os testículos direito e esquerdo, e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos com e sem recuperação de espermatozóides (Tabela II). O “power” Doppler dos testículos mostrou uma diferença significativa entre os pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (Teste exato de Fisher – $P=0,02$) e entre os grupos com e sem espermatozóides na biópsia testicular (Teste exato de Fisher – $P=0,001$) (Figura 1). A Tabela III mostra os achados de recuperação espermática em relação ao diagnóstico histológico.

Analisando a recuperação de espermatozóides em pacientes com azoospermia não-obstrutiva apenas, nós encontramos diferença estatística entre os grupos com e sem espermatozóides na biópsia testicular (Teste exato de Fisher – $P=0,006$) (Figura 2), e calculamos o índice de Spearman encontrando uma correlação de 62%. A sensibilidade do “power” Doppler para prever o sucesso da recuperação de espermatozóides foi de 100 % e a especificidade foi de 35%.

Discussão

Nossos dados mostram que a avaliação da microvascularização testicular realizada através da ultra-sonografia com “power” Doppler é capaz de diferenciar os casos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. Além disso, nós fomos capazes de demonstrar que o “power” Doppler pode prever a recuperação de espermatozoides na biópsia testicular. Assim, a tecnologia do “power” Doppler pode ser utilizada como uma valiosa arma na avaliação de pacientes azoospérmicos.

Esses pacientes usualmente são tratados com a associação da ICSI e procedimentos para obtenção de espermatozoides. Os métodos para obtenção de espermatozoides são agressivos e vários métodos para prever o achado de espermatozoides têm sido estudados (3,4). A realização de um diagnóstico diferencial adequado entre os casos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva é importante, pois um diagnóstico adequado auxiliará no prognóstico do paciente e sua orientação (2).

Pacientes com azoospermia obstrutiva possuem estrutura e funções do parênquima testicular preservados. Esses pacientes produzem espermatozoides e, usualmente, possuem problemas apenas no transporte espermático. A azoospermia obstrutiva é compatível com microvascularização testicular normal (6,9). Porém, pacientes com azoospermia não obstrutiva têm a estrutura testicular alterada, assim como o fluxo sanguíneo testicular. Estas características foram confirmadas em nosso estudo (6). O estudo da vascularização testicular tenta associar melhor fluxo sanguíneo com a função testicular (1,10). Nós demonstramos que pacientes com melhor microvascularização têm maior

probabilidade de ter espermatogênese. Regiões testiculares com fluxo sanguíneo normal e uniforme são supostas de possuir uma associação com a função testicular e com focos de espermatogênese (11,12).

Nosso grupo não encontrou alteração no fluxo sanguíneo testicular avaliado apenas com o Doppler colorido. Na avaliação de sistemas de baixo fluxo sanguíneo como testículo, a microvascularização usualmente pode ser avaliada apenas com a associação do “power” Doppler ao Doppler colorido (13). O Doppler colorido isoladamente não é capaz de avaliar o fluxo sanguíneo testicular (6, 11, 12, 14).

Outros autores têm demonstrado que as medidas de Doppler colorido das artérias transmediastinais intratesticulares são capazes de diferenciar pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (5). Pacientes com azoospermia não obstrutiva tiveram maiores índices de resistência. Em nossa amostra, nós não encontramos essa diferença. Nossos achados estão em concordância com os achados de autores que concluíram que há uma diferença no parênquima testicular entre os dois grupos, no entanto esta não pode ser evidenciada com o uso isolado do Doppler colorido. Ainda, outros pesquisadores utilizando um complexo sistema de estudo da avaliação testicular, também demonstraram que áreas testiculares com melhor vascularização possuem maior potencial de espermatogênese. Porém, este sistema é complexo e trabalhoso e nós acreditamos que um exame preditivo deve ser acessível, simples e rápido (8).

A pesquisa por fatores preditivos da recuperação de espermatozóides em azoospermia tem aumentado nas últimas duas décadas. Vários pesquisadores têm tentado definir um simples marcador para recuperação de espermatozóides. Inicialmente, os estudos iniciaram com o FSH. Os achados com os níveis de

FSH foram positivos, porém não definitivos devido ao grande número de casos falsos positivos e negativos. (5,9). Então, a Inibina B surgiu como um potencial fator preditivo para a recuperação de espermatozóides. Os dados demonstraram a Inibina B como um exame capaz de avaliar a função testicular e focos de espermatogênese. Alguns dados foram compatíveis com a predição de espermatozóides testiculares, no entanto outros autores observaram que em alguns pacientes mesmo com níveis de Inibina B alterados era possível encontrar espermatozóides. Estes dados controversos provavelmente revelam a heterogeneidade dos estudos (11).

Pacientes com azoospermia não obstrutiva são o grupo de pacientes que teria maior benefício no desenvolvimento de um fator preditivo para a recuperação de espermatozóides testiculares. Encontramos uma diferença significativa na avaliação por “power” Doppler para a predição de espermatozóides na biópsia testicular. Nossos dados estão em concordância com os de outros autores (1,6,7). Pacientes com azoospermia não obstrutiva possuem a microvascularização testicular alterada. Nós demonstramos que pacientes com grandes alterações no fluxo vascular testicular não possuem espermatozóides na biópsia testicular. O “power” Doppler demonstrou uma grande habilidade como um marcador de pacientes que não devem ser submetidos ao procedimento de recuperação de espermatozóides.

Os pacientes com azoospermia obstrutiva possuem uma alta probabilidade de sucesso na recuperação de espermatozóides testiculares. Estes pacientes devem ser orientados para realizar o procedimento de obtenção de espermatozóides. Por outro lado, pacientes com azoospermia não obstrutiva são o grupo no qual o “power” Doppler terá mais vantagens. O exame auxiliará a

predizer a função testicular e a recuperação de espermatozóides. Sendo assim, a avaliação testicular com “power” Doppler demonstrou que pacientes com azoospermia obstrutiva possuem melhor fluxo sanguíneo do que pacientes com azoospermia não obstrutiva, e, desta forma, a ultra-sonografia com “power” Doppler pode realizar o diagnóstico diferencial entre os dois grupos. Além disso, a ultra-sonografia com “power” Doppler é capaz de predizer a recuperação de espermatozóides na biópsia testicular. O “power” Doppler demonstrou que pacientes com azoospermia não obstrutiva possuem pior microvascularização do que pacientes com azoospermia obstrutiva.

References

1. Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998; 13: 3090-3093.
2. 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: 1974-1979.
3. Silber SJ, Steirteghem AC, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66: 110-117.
4. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-1692.

5. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Gossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80-86.
6. Battaglia C, Giulini S, Regnani G, Madgar I, Facchinetti F, Volpe A. Intratesticular Doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates, and nonobstructive sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 2001; 75: 1088-1094.
7. Ergun S, Stingl J, Holstein AF. Segmental angioarchitecture of testicular lobule in man. *Andrologia* 1994; 26: 143-150.
8. Eytan O, Har-Toov J, Fait G, Yavetz H, Hauser R, Yogev L, Botchan A, Bem-Yosef D, Elad D, Jaffa A. Vascularity index distribution within the testis: a technique for guiding testicular sperm extraction. *Ultrasound in Med & Biol* 2001; 27: 1171-1176.
9. Souza CAB, Cunha Filho JS, Santos D, Gratao A, Freitas FM, Passos EP. Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in nonobstructive azoospermic patients. *Int Urol Nephrol* 2003; 35: 53-7.
10. Ezeh Ui, Moore HD, Cooke ID. A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13: 3075-3080.
11. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Lycke N, Nilsson L, Werner C, Bergh C. Serial ultrasonography, hormonal profile and antisperm antibody response after testicular sperm aspiration. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 2621-2627.
12. Souza CAB, Fagundes P, Cunha F^o JSL, Freitas F; Passos EP. Power Doppler Ultrasonography in non-obstructive and obstructive azoospermia. In: 19 annual meeting of the ESHRE, 2003, Madrid. *Human Reproduction*. Londres:

Oxford University Press, 2003. v. 18, p. 197-198.

13. Passos EP, Fagundes P, Cunha F^o JSL, Freitas F, Souza CAB. Serial Power Doppler Ultrasonography after testicular sperm extraction. In: 19 annual meeting of the ESHRE, Madrid. Human Reproduction. Londres: Oxford University Press, 2003. v. 18, p. 202.

14. Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL, Adler RS. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. Radiol 1994; 190: 853-6.

15 Har-Toov J, Fait G, Houser R, Wolman I, Yavez H, Jaffa A. Can Doppler ultrasonographic measurements of the testis predict spermatozoa retrieval in azoospermic patients undergoing testicular biopsy? Fertil Steril 2001; 76: 1276-1277.

Tabela I. Distribuição das características dos pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva (média \pm DP)

	Obstrutiva (n=16)	Não obstrutiva (n=22)	<i>P</i> *
Idade	35,27 \pm 6,42	34,39 \pm 4,51	0,661
FSH	5,11 \pm 1,57	15,3 \pm 5,13	0,001
LH	3,54 \pm 1,31	4,60 \pm 1,77	0,102
Testosterona	4,44 \pm 1,60	4,26 \pm 1,87	0,181
Prolactina	7,01 \pm 4,44	8,51 \pm 4,79	0,802

* Teste t

Tabela II. Distribuição dos índices dos vasos intratesticulares e artérias testiculares em relação ao achado de espermatozoides na biópsia testicular.
(mediana,IC)

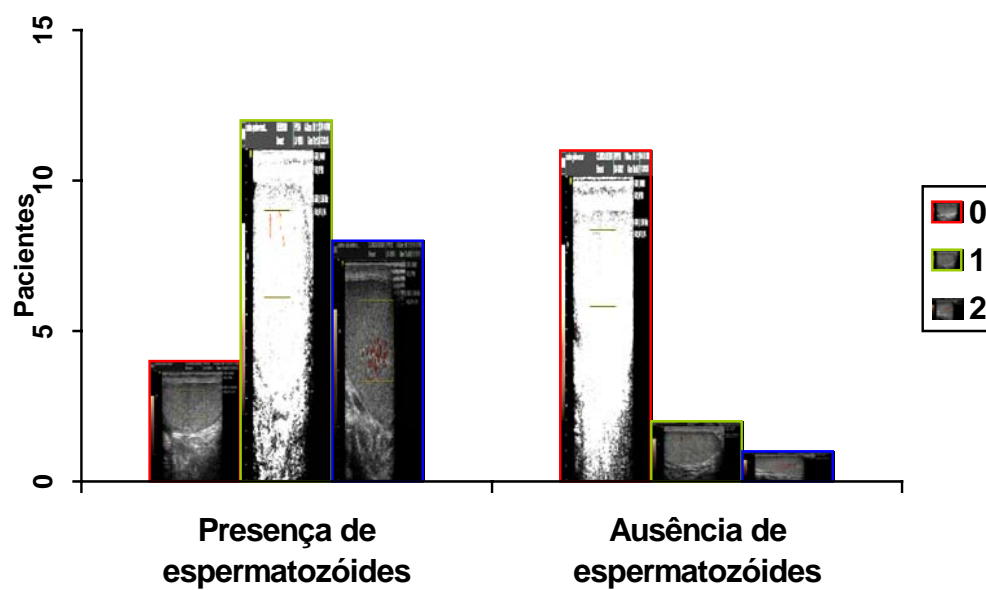
Índices testiculares	Presença de espermatozoides (n=24)	Ausência de espermatozoides (n=14)	<i>P</i>
Índice de pulsatilidade VIT	0,91 (0,82 – 1,15)	1,15 (0,92 – 1,68)	0,11
Índice de resistência VIT	0,60 (0,54 – 0,68)	0,66 (0,59 – 0,73)	0,19
Índice de pulsatilidade AT	1,61 (1,41 – 2,03)	1,64 (1,38 – 2,12)	0,47
Índice de resistência AT	0,81 (0,69 – 0,86)	0,86 (0,71 – 1,06)	0,38

(*Teste de Mann Whitney*)

Tabela III. Diagnósticos histológicos em relação à recuperação de espermatozoides testiculares.

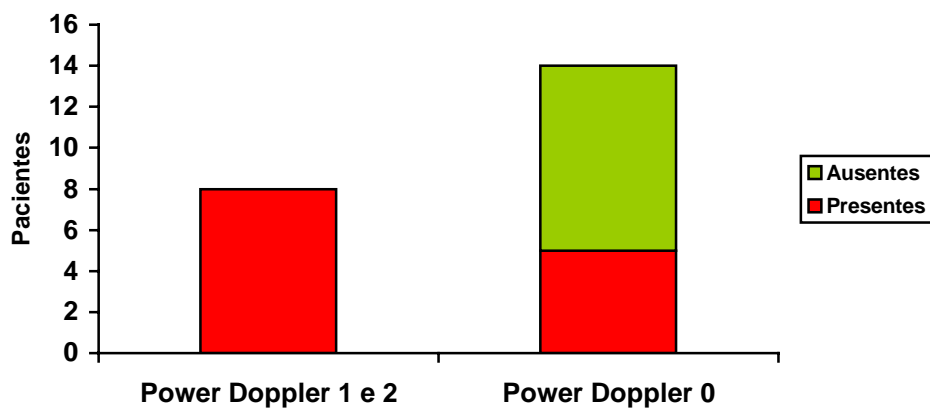
	Presença de espermatozoides (n=24)	Ausência de espermatozoides (n=14)
Espermatogênese	5 (13,2%)	0
Parada de maturação	4 (10,5%)	8 (21,1%)
Hipoespermatogênese	12 (31,5%)	0
Síndrome de células de Sertoli	3 (7,9%)	3 (7,9%)
Esclerose tubular	0	3 (7,9%)

Figura 1. Distribuição dos índices de “power” Doppler em relação à recuperação de espermatozoides testiculares.



Teste exato de Fisher – $P < 0,05$

Figura 2. Distribuição dos índices de “power” Doppler em relação a recuperação de espermatozóides em pacientes com azoospermia não obstrutiva.



Teste exato de Fisher $P= 0,006$