



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ARNOLD PETER PAUL ACHERMANN

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO HORMONAL COM GONADOTROFINAS COMO
TRATAMENTO PRÉVIO À RECUPERAÇÃO MICROCIRÚRGICA DE
ESPERMATOZOIDES EM HOMENS INFÉRTEIS PORTADORES DE
AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA E HIPOGONADISMO BIOQUÍMICO**

CAMPINAS

2024

ARNOLD PETER PAUL ACHERMANN

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO HORMONAL COM GONADOTROFINAS COMO
TRATAMENTO PRÉVIO À RECUPERAÇÃO MICROCIRÚRGICA DE
ESPERMATOZOIDES EM HOMENS INFÉRTEIS PORTADORES DE
AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA E HIPOGONADISMO BIOQUÍMICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em ciências, na área de Fisiopatologia
Cirúrgica.

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO

COORIENTADOR: PROF. DR. SANDRO CASSIANO ESTEVES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ARNOLD PETER PAUL ACHERMANN E ORIENTADO
PELO PROF. DR. CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO E
COORIENTADO PELO PROF. DR. SANDRO CASSIANO ESTEVES

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ac45e Achermann, Arnold Peter Paul, 1987-
Efeito da estimulação hormonal com gonadotrofinas como tratamento
prévio à recuperação microcirúrgica de espermatozoides em homens inférteis
portadores de azoospermia não-obstrutiva e hipogonadismo bioquímico /
Arnold Peter Paul Achermann. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Cássio Luís Zanettini Ricetto.
Coorientador: Sandro Cassiano Esteves.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Terapia de reposição hormonal. 2. Azoospermia não-obstrutiva. 3.
Gonadotrofinas. I. Ricetto, Cássio Luís Zanettini. II. Esteves, Sandro
Cassiano, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effect of hormonal stimulation with gonadotropins before
microsurgical sperm retrieval in infertile men with non-obstructive azoospermia and
biochemical hypogonadism

Palavras-chave em inglês:

Hormone replacement therapy

Non-obstructive azoospermia

Gonadotropins

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Sandro Cassiano Esteves [Coorientador]

Ricardo Destro Saade

Daniel Suslik Zylberztejn

Data de defesa: 25-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6736-2060>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3115738674172397>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA
DE MESTRADO
ARNOLD PETER PAUL ACHERMANN

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO
COORIENTADOR: PROF. DR. SANDRO CASSIANO ESTEVES

MEMBROS:

- 1. PROF.DR. SANDRO CASSIANO ESTEVES**
 - 2. PROF. DR. RICARDO DESTRO SAADE**
 - 3. PROF. DR. DANIEL SUSLIK ZYLBERSZTEJN**
-

Programa de Pós-graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de
Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 25/06/2024

DEDICATÓRIA

À Deus que me fortalece e orienta no melhor caminho a trilhar.

Aos meus pais, Elizabete Achermann e Mark Peter Achermann
que nunca pouparam esforços para minha formação pessoal e profissional.

À minha esposa Andréia Sayuri Sudo Achermann
pela compreensão, paciência e apoio incondicional durante todo o processo.

Aos meus amados filhos, Sebastian e Noah,
que com alegria contagiante e muito amor me deram forças
para seguir meus objetivos como pai e médico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sandro Cassiano Esteves pela amizade, por despertar em mim o interesse científico e constante orientação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto pela amizade, carinho e dedicação com minha formação como residente em Urologia, além de me apoiar e dar oportunidade em realizar esse sonho do mestrado na UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Ricardo Miyaoka por contribuir com minha formação como urologista e ser minha referência como urologista geral e andrologista.

A todos os integrantes da Clínica de Andrologia e Reprodução Humana da ANDROFERT, pela paciência e ajuda na coleta dos dados para elaboração desse estudo.

A todos os docentes e assistentes da Disciplina de Urologia que de diferentes formas contribuíram com minha formação como profissional em busca constante da excelência.

Aos casais com infertilidade, que mesmo em momento de ansiedade e expectativas para realizar o sonho de gerarem um filho, permitiram coletar informações de prontuário para que este estudo fosse possível e ajudasse tantos outros casais em situação semelhante no futuro.

RESUMO

Introdução: A azoospermia, definida pela ausência completa de espermatozoides no ejaculado, afeta aproximadamente 10% dos homens com infertilidade. Em cerca de 2/3 desses homens, a azoospermia está associada a uma falha na espermatogênese, reconhecida como a apresentação mais grave da infertilidade masculina. Através da recuperação cirúrgica de espermatozoides, é possível identificar áreas focais com atividade espermatogênica. No entanto, até o presente momento, as taxas de sucesso na recuperação espermáticas por meio de diferentes técnicas cirúrgicas variam de 20 a 60%, destacando a necessidade de aprimoramento. Com o objetivo de melhorar as taxas de sucesso na recuperação espermática, vários estudos têm explorado maneiras de otimizar a espermatogênese através de intervenções cirúrgicas e farmacológicas. A hipótese é que a adição de hCG recombinante possa contribuir para maiores taxas de sucesso ao estimular as células de Leydig a aumentar a produção endógena de testosterona (T) intratesticular, uma vez que a T é fundamental para a maturação dos espermatozoides nos estágios finais da espermatogênese.

Objetivos: Avaliar a ação da estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes nas taxas de sucesso da recuperação espermática através da microdissecção testicular (micro-TESE). Dentre os objetivos secundários foram avaliados: os fatores associados ao sucesso na recuperação espermática; as taxas de sucesso da recuperação espermática no grupo de pacientes com valores normais e elevados de FSH basais, utilizando como limite 12 UI/L; as taxas de sucesso da recuperação espermática de acordo com classes histopatológicas na população tratada e não-tratada; a frequência de eventos adversos na população tratada; a frequência de complicações pós-operatórias advindas da micro-TESE na população geral.

Materiais e Métodos: O estudo de coorte incluiu 616 pacientes com azoospermia não-obstrutiva (ANO) e hipogonadismo bioquímico (T total < 350 ng/dL), divididos entre grupo tratado (n=291) com gonadotrofinas recombinantes previamente a micro-TESE e grupo não tratado (n=325). Os pacientes apresentavam idade entre 21-55 anos e foram submetidos a avaliação clínica, laboratorial e histopatológica do parênquima testicular. Os pacientes tratados receberam hCG recombinante, com a possibilidade da adição de FSH recombinante e/ou inibidor de aromatase conforme protocolo da instituição. A razão de chances bruta e ajustada, assim como o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados para definir a relação entre preditores ao sucesso na recuperação espermática. Por meio de análise com regressão logística

multivariada avaliamos as associações entre variáveis e o sucesso da micro-TESE, tanto para população geral quanto para o grupo tratado.

Resultados: A taxa de sucesso da micro-TESE na população geral foi de 56,6%. O grupo tratado apresentou taxa de sucesso da micro-TESE significativamente maior comparado ao grupo não tratado (62,5% vs. 51,4%, $P=0,006$). Níveis basais de FSH ($P=0,04$), ausência de varicocele clínica ($P=0,04$), história de varicocelectomia prévia ($P=0,01$), uso da estimulação hormonal antes da micro-TESE ($P=0,0002$) e padrões histopatológicos obtidos das biópsias feitas durante a micro-TESE ($P<0,0001$) foram identificadas como fatores independentes ligados a um resultado positivo na recuperação de espermatozoides. Após a terapia hormonal, apenas 22,3% (65/291) dos pacientes mantiveram hipogonádicos, sendo que homens eugonádicos obtiveram maiores taxas na recuperação espermática (69,4% vs. 38,5%, $P<0,001$). Dentre os pacientes tratados, apenas os níveis de T total pré-micro-TESE ($P=0,028$) e delta T ($P<0,001$) foram independentemente associados ao sucesso da recuperação espermática. Níveis de T pré-micro-TESE de 418,5 ng/dL (AUC: 0,78) e delta T de 258 ng/dL (AUC: 0,76) diferenciaram o grupo de pacientes tratados entre sucesso e falha na recuperação espermática. Após ajuste do modelo de regressão, apenas pacientes normogonadotróficos ($FSH \leq 12$ UI/L) demonstraram significância estatística na razão de chances da recuperação espermática (OR ajustado 3,2, 1,59-6,44; $P=0,001$). Dentre os padrões histológicos, somente os pacientes com padrão histológico com parada de maturação demonstraram resposta à estimulação hormonal para maiores taxas de recuperação espermática ($P=0,004$), sendo aqueles com estágios de parada mais avançados os maiores beneficiados ao uso de estimulação hormonal para o sucesso da micro-TESE ($P=0,007$). Apenas 10,3% (30/291) dos pacientes apresentaram efeitos adversos atribuídos a estimulação hormonal, enquanto 2,3% (14/616) dos pacientes submetidos a micro-TESE apresentaram complicações pós-operatórias precoces.

Conclusão: A estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes demonstrou eficácia e segurança, com baixas taxas de efeitos adversos. Enquanto a causalidade não pode ser estabelecida, os achados deste estudo sugerem que pacientes com ANO e hipogonadismo bioquímico se beneficiam com a estimulação hormonal e correção de varicocele clínica previamente a micro-TESE. São necessários estudos em larga escala, multicêntricos e randomizados para confirmar esses achados e determinar a eficácia e segurança dessa abordagem antes da cirurgia de recuperação espermática.

Palavras chaves: Estimulação hormonal; Azoospermia não-obstrutiva; Gonadotrofinas

ABSTRACT

Introduction: Azoospermia, defined as the complete absence of spermatozoa in the ejaculate, affects approximately 10% of men with infertility. In about 2/3 of these men, azoospermia is associated with a spermatogenic failure, which has been recognized as the most severe presentation of male infertility. Surgical sperm retrieval can identify focal areas with spermatogenic activity. However, success rates in sperm retrieval through different surgical techniques currently range from 20 to 60%, highlighting the necessity for improvement. With the aim of enhancing success rates in sperm retrieval, numerous studies have explored ways to optimize spermatogenesis through surgical and pharmacological interventions. The hypothesis is that the addition of recombinant hCG may contribute to higher success rates by stimulating Leydig cells to increase endogenous intratesticular testosterone (T) production, as T is crucial for sperm maturation in the final stages of spermatogenesis.

Objectives: To evaluate the effect of hormonal stimulation with recombinant gonadotropins on success rates in sperm retrieval through microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE). Secondary objectives included evaluating factors associated with success in sperm retrieval, success rates in sperm retrieval for patients with normal and elevated baseline FSH values (using 12 IU/L as a threshold), success rates in sperm retrieval according to histopathological classes in the treated and untreated populations, the frequency of adverse events in the treated population, and the frequency of postoperative complications arising from micro-TESE in the overall population.

Materials and Methods: The cohort study included 616 patients with non-obstructive azoospermia (NOA) and biochemical hypogonadism (total T < 350 ng/dL), divided into a treated group (n=291) receiving recombinant gonadotropins prior to micro-TESE and an untreated group (n=325). Patients were aged between 21-55 years and underwent clinical, laboratory, and histopathological evaluation of the testicular parenchyma. Treated patients received recombinant hCG, with the possibility of adding recombinant FSH and/or aromatase inhibitors according to the institution's protocol. The crude and adjusted odds ratios and a 95% confidence interval (CI) were calculated to define the relationship between predictors and success in sperm retrieval. Multivariate logistic regression analysis assessed associations between variables and micro-TESE success for the overall population and the treated group.

Results: The micro-TESE success rate in the overall population was 56,6%. The treated group had a significantly higher micro-TESE success rate compared to the untreated group (62,5% vs. 51,4%, $P=0,006$). Baseline FSH levels ($P=0,04$), absence of clinical varicocele ($P=0,04$), history of prior varicocelectomy ($P=0,01$), use of hormonal stimulation before micro-TESE ($P=0,0002$), and histopathological patterns obtained from biopsies during micro-TESE ($P<0,0001$) were identified as independent factors linked to a positive outcome in sperm retrieval. After hormonal therapy, only 22,3% (65/291) of patients remained hypogonadal, with eugonadal men achieving higher rates in sperm retrieval (69,4% vs. 38,5%, $P<0,001$). Among treated patients, only pre-micro-TESE total T levels ($P=0,028$) and delta T ($P<0,001$) were independently associated with success in sperm retrieval. Pre-micro-TESE T levels of 418,5 ng/dL (AUC: 0,78) and delta T of 258 ng/dL (AUC: 0,76) differentiated the treated patient group between success and failure in sperm retrieval. After adjusting the regression model, only normogonadotropic patients ($FSH \leq 12$ IU/L) demonstrated statistical significance in the odds ratio for sperm retrieval (adjusted OR 3,2, 1,59-6,44; $P=0,001$). Among histological patterns, only patients with a histological pattern of maturation arrest showed a response to hormonal stimulation for higher rates of sperm retrieval ($P=0.004$), with those at more advanced stages of arrest benefiting the most from hormonal stimulation for micro-TESE success ($P=0,007$). Only 10,3% (30/291) of patients experienced adverse effects attributed to hormonal stimulation, while 2,3% (14/616) of patients undergoing micro-TESE had early postoperative complications.

Conclusion: Hormonal stimulation with recombinant gonadotropins demonstrated efficacy and safety, with low rates of adverse effects. While causality cannot be established, findings from this study suggest that patients with NOA and biochemical hypogonadism benefit from hormonal stimulation and correction of clinical varicocele before micro-TESE. Large-scale, multicenter, randomized studies are needed to confirm these findings and determine the effectiveness and safety of this approach before sperm retrieval surgery.

Keywords: Hormonal stimulation; Non-obstructive azoospermia; Gonadotropins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Regime terapêutico utilizado no presente estudo;	35
Figura 2.	Foto panorâmica do centro cirúrgico da ANDROFERT;	36
Figura 3.	Visão panorâmica do microscópio cirúrgico e cirurgiões executando o procedimento de micro-TESE;	37
Figura 4.	Etapas do procedimento de microdissecção testicular; A) Visão panorâmica do centro cirúrgico, microscópio e cirurgiões; B) Incisão da túnica albugínea; C) Dissecção microcirúrgica do parênquima testicular; D) Área focal contendo túbulos seminíferos de maior calibre no centro da foto. A ilustração no canto superior direito representa cortes transversais de túbulos seminíferos contendo espermatogênese ativa (seta verde) e outros apresentando ausência de células germinativas (seta azul); E) Placa de Petri contendo fragmento de parênquima testicular extraído; F) Dissecção mecânica dos túbulos seminíferos no estereomicroscópio; G) Análise da suspensão celular no microscópio invertido;	38
Figura 5.	A) Fragmentos de parênquima testicular extraídos durante a microdissecção testicular; B) Entrega da placa contendo os fragmentos de parênquima testicular pela enfermeira à embriologista;	39
Figura 6.	Aspecto final do testículo após a microdissecção testicular e sutura da túnica albugínea;	40
Figura 7.	Foto do Laboratório de Fertilização <i>In Vitro</i> da ANDROFERT	40
Figura 8.	Mapa visual da microdissecção testicular (vide texto explicativo);	41
Figura 9.	Fluxograma representando a população estudada;	47
Figura 10.	Curva ROC dos níveis de testosterona total pré-micro-TESE para a previsão de sucesso na recuperação de espermatozoides;	59
Figura 11.	Curva ROC de delta T para a previsão de sucesso na recuperação de espermatozoides.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características basais da população total submetida à extração de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE) e estratificada pelo uso ou não da estimulação hormonal. Valores representam medianas (intervalo inter-quartis) ou n (%);	49
Tabela 2.	Características da população total, submetida à extração de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE) e estratificado por resultado quanto à recuperação espermática. Os valores representam medianas (intervalo inter-quartis) ou n (%);	51
Tabela 3.	Associação entre as características da população total e o sucesso na recuperação espermática;	53
Tabela 4.	Razão de chances bruta e ajustada para sucesso na recuperação espermática de acordo com a estimulação hormonal com gonadotrofinas;	54
Tabela 5.	Características da população tratada, submetida à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE) e estratificada pelo resultado da recuperação de espermatozoides. Os valores representam medianas (intervalo inter-quartis) ou n (%);	56
Tabela 6.	Associação das características do paciente e sucesso na recuperação espermática na população tratada;	58
Tabela 7.	Taxas de recuperação espermática de acordo com padrões histopatológicos na população total. Valores representados pelo n (%).	61
Tabela 8.	Taxas de recuperação de espermatozoides de acordo com padrões histopatológicos e estimulação hormonal com gonadotrofina antes da micro-TESE. Os valores são n (%);	62
Tabela 9.	Complicações pós-operatórias precoces (dentro de 30 dias) relatadas nos 616 pacientes submetidos à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE);	63
Tabela 10.	Efeitos adversos relatados nos 291 pacientes que receberam terapia com gonadotrofina.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	Cr�terio de Informação Akaike (do inglês <i>Alkaike information criterion</i>)
ANO	Azoospermia Não-Obstrutiva
AO	Azoospermia Obstrutiva
AUC	�rea Sob a Curva (do inglês <i>Area under the curve</i>)
AZF	Fator de Azoospermia (do inglês <i>Azoospermia Factor</i>)
BIC	Cr�terio de Informação Bayesiano (do inglês <i>Bayesian information criterion</i>)
cm	Centímetro
dL	Decilitro
DMR	Dados do Mundo Real
DNA	�cido Desoxirribonucleico
ECLIA	Eletroquimioluminescência
ECR	Ensaio Clínico Randomizado
E2	Estradiol
FIV	Fertilização <i>in Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante (do inglês <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>)
g	Gramma
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina (do inglês <i>Gonadotrophin-Releasing Hormone</i>)
hCG	Gonadotrofina Cori�nica Humana (do ingl�s <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
Hipo	Hipoespermatog�nese
IC	Intervalo de Confian�a
ICSI	Inje��o Intracitoplasm�tica de Espermatozoides (do ingl�s <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>)
IMC	�ndice de Massa Corporal
ISO	Organização de Padroniza��o Internacional (do ingl�s <i>International Standardization Organization</i>)
Kg	Quilograma
L	Litros
LASSO	Operador de Redução e Seleção Mínima Absoluta (do inglês <i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>)

LH	Hormônio Luteinizante (do inglês <i>Luteinizing Hormone</i>)
MA	Parada de Maturação (do inglês <i>Maturation Arrest</i>)
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
Micro-TESE	Extração de Espermatozoides Testiculares por Microdissecção (do inglês <i>Microdissection Testicular Sperm Extraction</i>)
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m ²	Metro Quadrado
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de Chances (do inglês <i>Odds Ratio</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pg	Picograma
RA	Receptor Androgênico
rec-FSH	Hormônio Folículo-Estimulante Recombinante
rec-hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana Recombinante
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristics</i>)
SC	Subcutâneo
SCO	Somente Células de Sertoli (do inglês <i>Sertoli Cell-Only</i>)
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônio Sexual (do inglês <i>Sexual Hormone Binding Globulin</i>)
SRR	Taxa de Recuperação Espermática (do inglês, <i>Sperm Retrieval Rates</i>)
STS	Locais de Sequência Alvo (do inglês <i>Sequence-Tagged Sites</i>)
T	Testosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TESA	Aspiração de Espermatozoides Testiculares (do inglês <i>Testicular Sperm Aspiration</i>)
TESE	Extração de Espermatozoides Testiculares (<i>Testicular Sperm Extraction</i>)
TIT	Testosterona Intratesticular

TL	Testosterona Livre
TRUS	Ultrassonografia Transretal (do inglês <i>Transrectal Ultrasound</i>)
TT	Testosterona Total
US	Ultrassonografia
UI	Unidade Internacional
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Azoospermia Não-Obstrutiva e Eixo Hormonal.....	19
1.2. Estimulação da Espermatogênese na Azoospermia Não-Obstrutiva.....	20
1.3. Estimulação da Espermatogênese com uso de hCG.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Primário.....	23
2.2. Objetivos Secundários.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Desenho do Estudo.....	24
3.2. Ética.....	24
3.3. Financiamento.....	24
3.4. Participantes.....	24
3.4.1. Critérios de Inclusão.....	24
3.4.2. Critérios de Exclusão.....	25
3.5. Avaliação Andrológica e Diagnóstico da ANO.....	25
3.5.1. Anamnese.....	25
3.5.2. Exame Físico.....	26
3.5.3. Análise Seminal.....	26
3.5.4. Exames Hormonais.....	27
3.5.5. Estudo Genético.....	28
3.5.6. Estudo de Imagem.....	29
3.5.7. Biópsia de Testículo.....	29
3.5.8. Diagnóstico de ANO.....	30
3.6. Estimulação Hormonal.....	31
3.6.1. Consentimento Informado.....	31
3.6.2. Protocolo Terapêutico da Estimulação Hormonal e Seguimento.....	32
3.6.2.1. Estimulação Hormonal.....	32
3.6.2.2. Seguimento.....	33
3.6.2.3. Ajustes Terapêuticos.....	33
3.6.3. Registro de Eventos Adversos.....	36
3.7. Micro-TESE.....	36
3.7.1. Considerações Pré-Operatórias.....	36

3.7.2. Técnica Cirúrgica.....	37
3.7.3. Processamento do Parênquima Testicular.....	40
3.7.4. Análise Histopatológica.....	42
3.7.5. Cuidados e Seguimento Pós-Operatório.....	43
3.8. Processamento e Análise dos Dados.....	44
3.9. Análise Estatística.....	45
3.9.1. Hipótese Nula sobre o Desfecho Primário.....	45
3.9.2. Cálculo do Tamanho Amostral.....	45
3.9.3. Análises Descritiva e Comparativa.....	46
3.9.4. Regressão Logística.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Participantes.....	47
4.2. Resultados Principais.....	48
4.3. Resultados Secundários.....	52
4.3.1. Fatores Associados com Recuperação Espermática Positiva.....	52
4.3.2. Características dos Pacientes Tratados com Recuperação Espermática Positiva e Negativa.....	54
4.3.3. Resultados da Recuperação Espermática de acordo com os Resultados da Histopatologia.....	61
4.3.4. Complicações Pós-Operatórias.....	62
4.3.5. Efeitos Adversos por Uso de Gonadotrofina.....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
5.1. Principais achados.....	66
5.2. Interpretação dos achados.....	67
5.2.1. Espermatogênese e ação das gonadotrofinas.....	68
5.2.1.1. Ação do hCG exógeno na produção de testosterona.....	71
5.2.1.2. Ação do hCG exógeno sobre níveis de FSH.....	74
5.2.2. Varicocelektomia e ANO.....	75
5.3. Relevância clínica dos achados.....	76
5.4. Comparação com outros estudos da literatura.....	79
5.5. Efeitos adversos e complicações.....	83
5.6. Limitações.....	84
5.7. Perspectivas futuras.....	88
6. CONCLUSÃO.....	90

7. REFERÊNCIAS.....	92
8. APÊNDICES.....	111
9. ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

A azoospermia não obstrutiva (ANO) afeta entre 5 a 15% dos homens submetidos à avaliação de infertilidade, representando aproximadamente 60% de todos os casos de azoospermia [Cocuzza et al., 2013; Esteves, 2015a]. A ANO pode ter origens diversas que culminam na falha espermatogênica, incluindo anormalidades congênitas e genéticas (como criptorquidia, síndrome de Klinefelter e microdeleções do cromossomo Y), doenças adquiridas (como orquite e trauma testicular) e exposição a agentes gonadotóxicos (como radioterapia e quimioterapia). No entanto, em muitos casos, a etiologia permanece desconhecida, sendo classificada como idiopática [Esteves, 2015a; Andrade et al., 2021].

1.1. Azoospermia Não-Obstrutiva e Eixo Hormonal

Homens com ANO causada por alterações testiculares primárias frequentemente apresentam sinais de hipogonadismo, incluindo baixos níveis de testosterona e testículos de tamanho reduzido (<15 ml ou $<4,6$ cm no maior eixo) [Schoor et al., 2002; Andrade et al., 2021]. Cerca de metade desses pacientes exibe níveis séricos de testosterona total (TT) abaixo de 300 ng/dL, refletindo uma possível insuficiência das células de Leydig, seja quantitativa ou qualitativa [Sussman et al., 2008; Reifsnyder et al., 2012; Salonia et al., 2019]. Os níveis circulantes de testosterona geralmente servem como um indicador do estado intratesticular de testosterona, dado que os testículos contribuem com mais de 95% das concentrações totais de testosterona [Roth et al., 2010]. O hipogonadismo bioquímico, caracterizado por baixos níveis de testosterona na circulação, afeta mais da metade dos pacientes com ANO [Bobjer et al., 2012; Reifsnyder et al., 2012]. A redução dos níveis de testosterona pode agravar ainda mais a espermatogênese nos testículos de pacientes com ANO [Shiraishi et al., 2017; Levalle et al., 1994], dada a importância crucial da testosterona na espermatogênese, atuando sinergicamente com o hormônio folículo-estimulante (FSH) nas células de Sertoli para apoiar o desenvolvimento das células germinativas [França et al., 2016; Oduwole et al., 2018].

Elevados níveis de FSH, superiores a 7,6 UI/L, são observados em mais de 90% dos homens com ANO [Schoor et al., 2002; Gudeloglu et al., 2013]. No entanto, a amplitude de secreção hipofisária de FSH e LH nesses pacientes é baixa, resultando em uma estimulação paradoxalmente mais fraca das células de Leydig e Sertoli [Levalle et al., 1994; Sussman et al.,

2008; Shiraishi et al., 2012; Shiraishi et al., 2017; Santi et al., 2020]. Além disso, evidências provenientes de estudos animais e humanos sugerem que níveis circulantes excessivos de FSH podem induzir a regulação negativa dos receptores de FSH na célula de Sertoli, comprometendo sua estimulação adequada [Gnanaprakasam et al., 1979; Namiki et al., 1985; Namiki et al., 1987; Themmen et al., 1991; Foresta et al., 2004; Zhang et al., 2012].

1.2. Estimulação da Espermatogênese na Azoospermia Não-Obstrutiva

Com base nessas considerações, há especulações sobre a utilidade clínica da estimulação hormonal em homens com ANO e hipogonadismo normogonadotrófico ou hipergonadotrófico, com o objetivo principal de aumentar a produção intratesticular de testosterona (TIT) [Reifsnyder et al., 2012; Esteves, 2015a]. Moduladores seletivos de receptores de estrogênio, inibidores de aromatase, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e FSH têm sido utilizados de forma off-label para modular os hormônios reprodutivos masculinos, otimizando a produção de TIT e, conseqüentemente, a espermatogênese, com o objetivo final de aumentar as taxas de sucesso da recuperação cirúrgica de espermatozoides [Gregoriou et al., 2012; Shiraishi et al., 2016; Klami et al., 2018; Cannarella et al., 2019]. Estudos de série de casos e alguns estudos de coorte indicam que tais tratamentos podem estimular a produção espermática, resultando em taxas aumentadas de recuperação cirúrgica de espermatozoides e, em alguns casos, até mesmo permitindo o aparecimento de espermatozoides no ejaculado [Shiraishi, 2014; Laursen et al., 2019; Tharakan et al., 2020; Andrade et al., 2021].

1.3. Estimulação da Espermatogênese com uso de hCG

O tratamento com hCG, em particular, melhora notavelmente a produção de TIT em homens com ANO [Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Mehmood et al., 2019; Laursen et al., 2019; Çayan et al., 2021]. O hCG é uma glicoproteína produzida principalmente pelas células sincitiotrofoblásticas da placenta durante a gravidez. Ele se liga ao receptor de membrana LH/hCG nas células de Leydig e, portanto, imita o efeito do LH [Esteves et al., 2023]. Porém, o hCG é mais potente que o LH para estimular a esteroidogênese, devido principalmente a sua meia-vida que é mais longa que o LH. Após administração endovenosa, o tempo de meia-vida do LH é de 60 minutos, enquanto do hCG é de 36 horas [Fink et al., 2020]. Por outro lado, após administração subcutânea, o tempo de meia-vida do hCG é de cerca de 32-33 horas, ao passo que do LH é de cerca de 21-24 horas [Ezcurra et al., 2014].

Após a administração de hCG, a TIT aumenta de forma dose-dependente, refletindo-se na elevação dos níveis de testosterona circulantes [Roth et al., 2010a; Crosnoe et al., 2013]. Além de estimular a produção de testosterona, o tratamento com hCG reduz os níveis de FSH endógeno, aparentemente pela ação direta da testosterona circulante, aumentada, no eixo hipotálamo-hipofisário [Shiraishi et al., 2012; Shiraishi, 2014; Laursen et al., 2019]. A redução dos níveis séricos de FSH nos pacientes com ANO e hipogonadismo hipergonadotrófico parece aumentar a expressão dos receptores de FSH nas células de Sertoli e, conseqüentemente, melhorar a função delas [Foresta et al., 2004; Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Hu et al., 2018].

Estudos do tipo série de casos mostraram taxas de sucesso na recuperação de espermatozoides 10-15% maiores nos pacientes submetidos à terapia hormonal com hCG, quando comparados a pacientes não tratados [Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Oka et al., 2017]. Além disso, parece existir uma relação positiva entre os níveis normais de testosterona no soro e a probabilidade de sucesso na extração de espermatozoides [Mehmood et al., 2019; Guo et al., 2020; Caroppo et al., 2021]. No entanto, ainda não está estabelecido se os níveis séricos de testosterona poderiam ser utilizados como biomarcadores da espermatogênese e, caso afirmativo, quais seriam os níveis ideais. Além disso, as razões pelas quais alguns indivíduos respondem ao tratamento, enquanto outros não, são desconhecidas, mas especula-se que a existência de parada de maturação germinativa ou espermatogênese focal, na histologia testicular, seja um preditor positivo da resposta terapêutica.

Embora exista alguma evidência sobre a eficácia do tratamento com gonadotrofinas para homens com ANO, faltam estudos de coorte com casuística adequada e ensaios clínicos randomizados (ECRs). Além disso, faltam dados sobre efeitos colaterais, riscos e resultados reprodutivos após o tratamento com gonadotrofinas exógenas em homens com ANO, impossibilitando recomendações clínicas [Minhas et al., 2021]. Nesse contexto, os ECRs são considerados mais importantes do que os de estudos observacionais. Porém, estudos com dados do mundo real (DMR) podem ser comparativamente válidos [Benson et al., 2000]. Os DMR referem-se a dados observacionais obtidos durante a prática clínica de rotina [Sherman et al., 2016; Ford et al., 2016], ou seja, dados derivados de populações heterogêneas, grandes, idealmente não selecionadas, com padrões de qualidade aceitáveis para a(s) fonte(s) de onde os dados se originaram. Foi demonstrado que os dados de estudos observacionais bem desenhados não superestimaram, de forma consistente ou sistemática, a magnitude dos efeitos do tratamento [Benson et al., 2000], particularmente quando rigor metodológico é aplicado, como os descritos

na lista de verificação GRACE (*Good ReseArch for Comparative Effectiveness*) [Dreyer et al., 2016].

Os estudos com DMR também podem oferecer a oportunidade de obter informações sobre pacientes com características distintas daquelas normalmente exigidas para elegibilidade nos ECRs. Na prática clínica, mais de 99% dos pacientes com infertilidade, submetidos a tratamento, não se enquadram nos critérios de inclusão dos ECRs [Stocking et al., 2019; Wang et al., 2020]. Os DMR permitem ainda avaliar como a terapia afeta uma população heterogênea, gerando hipóteses a serem testadas em ECRs. Além disso, tais estudos podem ser úteis na obtenção de informações sobre a viabilidade de um ECR, como por exemplo, o impacto dos critérios de inclusão e exclusão para que se atinja o tamanho amostral desejado. Informar distribuições de probabilidade, identificando indicadores, prognósticos ou características basais dos pacientes para enriquecimento ou estratificação, são outras vantagens dos estudos observacionais com DMR. [Benson et al., 2000; Liu et al., 2022].

Neste trabalho, realizamos um estudo observacional retrospectivo, utilizando DMR, para avaliar o papel da estimulação hormonal com gonadotrofinas exógenas nas taxas de sucesso da recuperação de espermatozoides, numa população de homens inférteis com ANO e hipogonadismo normogonadotrófico ou hipergonadotrófico, submetidos à micro-TESE. Nossa hipótese é que a otimização da produção de TIT e a redução dos níveis de FSH séricos com o uso do hCG nesses pacientes melhoram a espermatogênese e, portanto, as chances de sucesso na recuperação de espermatozoides.

Informações detalhadas sobre Azoospermia, espermatogênese, recuperação espermática e estimulação hormonal podem ser encontradas no **Anexo 1**.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Primário:

- Avaliar a taxa de sucesso da recuperação microcirúrgica de espermatozoides de acordo com o uso ou não da estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes (rec-hCG e rec-FSH) previamente à micro-TESE em homens inférteis com azoospermia não-obstrutiva e hipogonadismo bioquímico.

2.2. Objetivos Secundários:

- Avaliar os fatores associados ao sucesso da recuperação microcirúrgica de espermatozoides;
- Avaliar as taxas de sucesso da recuperação microcirúrgica de espermatozoides no grupo de pacientes com valores normais e elevados de FSH basais, utilizando como limite 12 UI/L [[Tharakan et al., 2022](#)];
- Avaliar as taxas de sucesso da recuperação microcirúrgica de espermatozoides de acordo com classes histopatológicas na população tratada e não-tratada;
- Avaliar a frequência de eventos adversos na população tratada com gonadotrofinas;
- Avaliar a frequência de complicações pós-operatórias advindas da micro-TESE na população geral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo

Este é um estudo observacional baseado na análise retrospectiva de dados consecutivos de homens inférteis com ANO, tratados num serviço terciário de medicina reprodutiva (ANDROFERT, Campinas, Brasil), no período de janeiro de 2014 a setembro de 2021. O estudo seguiu as diretrizes para relatórios de estimativas de saúde precisos e transparentes (GATHER) e os padrões para relatos de estudos observacionais (STROBE) [[Vandenbroucke et al., 2007](#); [Stevens et al., 2016](#)].

3.2. Ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (CAAE 23217119.9.0000.5404).

3.3. Financiamento

Uma bolsa de pesquisa da ANDROFERT apoiou os custos relacionados à extração de dados e à análise estatística.

3.4. Participantes

3.4.1. Critérios de Inclusão

Os pacientes elegíveis foram homens com ANO, apresentando idade entre 21 e 55 anos, com hipogonadismo bioquímico, e submetidos à recuperação de espermatozoides pela técnica microcirúrgica (micro-TESE), após terem recebido ou não estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes (coriofolitrofina alfa isolada ou associada à folitrofina alfa) por um período de pelo menos 3 meses antes da micro-TESE. O diagnóstico de ANO foi baseado nos achados de uma avaliação andrológica completa e confirmado pelos resultados da histopatologia testicular, conforme detalhado nas seções seguintes. O hipogonadismo bioquímico foi definido pela presença de níveis de TT abaixo de 350 ng/dL, medidos no soro a partir de uma amostra de sangue venoso coletada pela manhã, e confirmada numa análise subsequente após um intervalo de pelo menos uma semana [[Buvat et al., 2013](#)]. Foram incluídos apenas pacientes com hipogonadismo bioquímico, cujos níveis séricos de FSH eram normais

ou elevados (normogonadotróficos e hipergonadotróficos), ANO confirmada pela histopatologia, ausência de microdeleções envolvendo as regiões AZFa e/ou AZFb do cromossomo Y, e registro de dados completos para os desfechos primários e secundários.

3.4.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes com níveis basais de TT >350 ng/dL, aqueles com histórico de recuperação prévia de espermatozoides, além dos indivíduos que utilizaram qualquer medicação/intervenção com efeitos gonadotóxicos conhecidos (por exemplo, quimioterapia, radioterapia, testosterona exógena), com intervalo inferior a 6 meses da inclusão. Também foram excluídos pacientes que usaram moduladores seletivos de receptores de estrogênio de forma isolada ou combinada com gonadotrofinas, além daqueles que utilizaram gonadotrofinas urinárias, ou mesmo gonadotrofinas recombinantes, porém por menos de 3 meses antes da recuperação espermática. Além disso, pacientes com ANO devido ao hipogonadismo hipogonadotrófico (ex., indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito ou adquirido, apresentando níveis séricos de TT<350 ng/dL, FSH<1,5 UI/L e LH <1,5 IU/L), bem como pacientes com azoospermia obstrutiva, foram excluídos. Por fim, excluímos os pacientes que tiveram espermatozoides viáveis detectados no ejaculado a fresco em alguma análise de sêmen de rotina de acompanhamento a qualquer momento antes da micro-TESE. Nesses casos, a micro-TESE foi cancelada e, portanto, o exame histopatológico não foi obtido para confirmar o diagnóstico de ANO.

3.5. Avaliação Andrológica e Diagnóstico da ANO

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação andrológica abrangente antes da inclusão. A avaliação incluiu a anamnese, exame físico, análise seminal, exames hormonais, estudo genético, exame de imagem (caso indicado), conforme protocolo da instituição [[Esteves et al., 2011a](#)] e detalhado abaixo.

3.5.1. Anamnese

A anamnese incluiu os seguintes itens: (i) história de infertilidade (idade dos parceiros, duração da infertilidade, tratamento prévio), (ii) história sexual (libido, disfunção erétil, ejaculação), (iii) infância e desenvolvimento (criptorquidia, hérnia, trauma testicular, torção testicular, infecção, desenvolvimento sexual, puberdade). (iv) histórico pessoal (doenças

sistêmicas, doenças sexualmente transmissíveis), (v) histórico médico/cirúrgico (orquidopexia, herniorrafia, orquiectomia, cirurgia retroperitoneal e pélvica, outras cirurgias inguinais, escrotais e perineais, cirurgia bariátrica, cirurgia do colo vesical, ressecção transuretral da próstata), (vi) exposição a agentes potencialmente gonadotóxicos (por exemplo, pesticidas, quimioterápicos, sulfassalazina, alopurinol, colchicina, finasterida), solventes orgânicos, metais pesados, esteroides anabolizantes, terapia de reposição de testosterona, altas temperaturas, radiação ionizante), (vii) história familiar (infertilidade na família), (viii) fatores relacionados ao estilo de vida (tabagismo, uso de bebidas alcoólicas, drogas ilícitas) e (ix) estado geral de saúde.

3.5.2. Exame Físico

O exame físico foi realizado por andrologistas experientes da Clínica Androfert (Dr. Sandro C. Esteves e Dr. Ricardo Miyaoka) e incluiu a avaliação das características sexuais secundárias e exame genital. A avaliação das características sexuais secundárias concentrou-se no desenvolvimento sexual, distribuição de pelos corporais e presença de ginecomastia. Cada paciente teve seu índice de massa corporal (IMC) calculado. Cicatrizes nas áreas inguinais ou genitais, que poderiam indicar possíveis lesões no suprimento sanguíneo testicular e ducto deferente, foram anotadas. O volume testicular foi registrado com o orquidômetro de Prader durante o exame escrotal. A textura e consistência testicular também foram avaliadas. O cordão espermático foi examinado em uma sala aquecida com o paciente em decúbito dorsal e em ortostase. Varicoceles palpáveis foram classificadas como pequenas (Grau 1; apenas palpável durante a manobra de Valsalva), tamanho moderado (Grau 2; palpável em repouso) e grande (Grau 3; visível e palpável em repouso) [Dubin et al., 1970; Zylbersztejn & Esteves, 2020].

3.5.3. Análise Seminal

Pelo menos duas análises seminais foram realizadas com um mínimo de duas semanas de intervalo para confirmar o diagnóstico de azoospermia. As análises foram realizadas no laboratório de Andrologia da ANDROFERT. O laboratório é certificado pela ISO 9001 (do inglês, *International Standardization Organization*) desde 2010. Os técnicos que realizam as análises de sêmen participam de programas internos e externos de controle de qualidade e de proficiência. Os pacientes receberam instruções escritas e verbais sobre a coleta das amostras. Eles foram orientados a coletar suas amostras após 2 a 3 dias de abstinência ejaculatória. As amostras foram coletadas por meio de masturbação em uma sala privada

próxima ao laboratório usando um recipiente limpo e de boca larga. A perda de qualquer fração das amostras foi registrada e foi solicitado ao paciente repetir a coleta em outra ocasião.

Após a coleta, as amostras foram mantidas em uma incubadora a uma temperatura de 37 °C por 30 a 60 minutos para liquefação. Em seguida, as amostras foram analisadas de acordo com a quinta edição do manual de laboratório da Organização Mundial da Saúde (OMS) para examinar e processar o sêmen humano [WHO, 2010]. Todas as amostras que inicialmente apresentavam ausência de espermatozoides foram submetidas à centrifugação a 3000g por 15 minutos. O sedimento foi meticulosamente examinado sob microscopia óptica de campo claro para a procura de qualquer espermatozoide a fim de descartar o diagnóstico de criptozoospermia, definida pela presença de raros espermatozoides detectados após uma extensa pesquisa microscópica. Ejaculados apresentando hipospermia (volume <1,5 ml) e pH baixo (<7,2) foram avaliados quanto à presença de frutose usando um ensaio colorimétrico. Além disso, um exame de urina pós-ejaculatório foi realizado em uma ocasião separada nos homens com ejaculados hipospérmicos e pH normal para descartar ejaculação retrógrada.

3.5.4. Exames Hormonais

A avaliação hormonal padrão consistiu na medição dos níveis séricos de FSH, LH, estradiol (E2), TT e testosterona livre (TL). As análises foram realizadas num laboratório credenciado pela Instituição (Sabin Medicina Diagnóstica, Campinas, Brasil). Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas após jejum noturno, pela manhã, entre 8h e 10h, para minimizar a influência da variação circadiana nos hormônios reprodutivos [Gupta et al., 2000; Wu et al., 2010; Salonia et al., 2021]. Os hormônios foram medidos usando kits comerciais do ensaio Elecsys (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com o método de eletroquimioluminescência (ECLIA, do inglês *Electrochemiluminescence Immunoassay*). As análises foram realizadas em um sistema automatizado (Analisador E170, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As características do ensaio, intervalos de referência, limite inferior de detecção, variabilidade interensaio e intraensaio estão descritos no **Anexo 2**. Os valores de TL não foram medidos diretamente, mas sim calculados a partir do método de Vermeulen [Vermeulen et al., 1999]. Há boa correlação entre os valores calculados de TL e aqueles obtidos por diálise de equilíbrio [Vermeulen et al., 1999]. Na rotina da avaliação do paciente infértil na Androfert, utiliza-se a determinação tanto da TT quanto da TL, embora as diretrizes para diagnóstico e manejo do hipogonismo recomendem a determinação da TT como triagem inicial, e complementação com a TL nos casos cujos valores de TT estejam próximos dos

limites inferiores de normalidade, e nos casos em que exista suspeita de alterações na SHBG (ex., idade avançada, doenças hepáticas) [Keevil et al., 2019].

No presente estudo, o valor de corte para determinação do hipogonadismo bioquímico foi de 350 ng/dL, por ser este o valor mais utilizado por diversas sociedades internacionais, e o mais representativo na avaliação de uma população de homens na idade reprodutiva (Anexo 3) [Esteves et al., 2024].

3.5.5. Estudo Genético

O estudo genético incluiu a pesquisa de microdeleções no cromossomo Y e análise citogenética. As análises foram realizadas em laboratórios externos e basearam-se na triagem de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico por meio de amostras de sangue venoso e isolamento de suspensão de linfócitos plasmáticos.

A triagem de microdeleções do cromossomo Y foi realizada usando análise de reação em cadeia da polimerase (do inglês PCR, *polymerase chain reaction*) de locais de sequências alvo (do inglês STS, *sequence-tagged sites*) para mapear as regiões específicas de AZF do cromossomo Y. Pelo menos oito marcadores STSs críticos (sY14, ZFX/ZFY, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255) foram selecionados, seguindo as recomendações da Academia Europeia de Andrologia e da Rede Europeia de Qualidade de Genética Molecular [Simoni et al., 2004]. A análise citogenética foi realizada por cariotipagem em banda G para detectar aneuploidia cromossômica e alterações estruturais. O método envolve a estimulação da mitose dos linfócitos com parada da divisão celular no estágio de metáfase usando colchicina [Hamada et al., 2013].

Pacientes com anormalidades genéticas detectadas na triagem foram aconselhados sobre a associação causal entre ANO e o defeito genético relevante, a probabilidade de sucesso na recuperação de espermatozoides por micro-TESE, e as chances de transmitir o defeito para a prole através da reprodução assistida. Especificamente, os pacientes exibindo anormalidades cariotípicas, como Síndrome de Klinefelter na forma mosaico (46,XY/47,XXY) ou não mosaico (47,XXY), e aqueles com deleções isoladas na região AZF do cromossomo Y foram considerados elegíveis para micro-TESE, e receberam aconselhamento genético. Por outro lado, pacientes com cariótipo 46,XX, ou com deleções de AZFa e/ou AZFb foram excluídos do estudo, pois de acordo com a literatura as chances de encontrar espermatozoides por micro-TESE são praticamente nulas [Esteves et al., 2011a; Simoni et al., 2004].

3.5.6. Estudo de Imagem

A ultrassonografia (US) escrotal foi realizada nos pacientes com anormalidades testiculares detectadas no exame físico (por exemplo, presença de qualquer nódulo palpável ou área endurecida no testículo ou epidídimo) e naqueles com hidrocele volumosa que impossibilitava a avaliação do volume testicular. Os exames foram realizados em clínicas de imagem externas referenciadas pela Instituição, com ultrassom Doppler colorido e probe linear de alta frequência (7-15 MHz) [Liguori et al., 2004; Pilatz et al., 2011]. O exame do parênquima testicular foi realizado com o paciente em decúbito dorsal, por meio de varreduras longitudinais, oblíquas e transversais. Os diâmetros máximos de ambos os testículos (altura, largura e comprimento) foram medidos para calcular o volume testicular usando a fórmula elipsoide [Schurich et al., 2009]. Embora o plexo pampiniforme também tenha sido estudado bilateralmente em pacientes submetidos ao exame de US escrotal, apenas as varicoceles detectadas pelo exame físico foram consideradas clinicamente relevantes.

A ultrassonografia transretal (TRUS) foi realizada nos pacientes que apresentaram hipospermia (volume ejaculado <1,5 mL) e pH seminal ácido para descartar uma obstrução distal nos locais dos ductos ejaculatórios, vesículas seminais ou próstata. O exame foi realizado com transdutor endorretal biplanar de 5-7 MHz para avaliar a presença de vesículas seminais dilatadas ou qualquer anormalidade que pudesse obstruir os ductos ejaculatórios (por exemplo: cistos da linha média, calcificações dos ductos ejaculatórios, cálculos hiperecoicos da vesícula seminal). A USTR foi utilizada como método de escolha para tal avaliação, pois estudos que investigaram métodos de imagem para o diagnóstico de obstrução do ducto ejaculatório têm sugerido a utilização do TRUS como abordagem inicial, sendo a ressonância magnética reservada para situações de incerteza, devido ao seu custo elevado, menor disponibilidade e limitação na identificação de calcificações [Esteves et al., 2011a; Achermann et al., 2021a].

3.5.7. Biópsia de Testículo

Uma biópsia testicular diagnóstica foi realizada nos pacientes cujo diagnóstico de ANO não pôde ser estabelecido por meio de história clínica, exame físico, testes genéticos e estudos de imagem. Esses casos referiam-se a pacientes com FSH e volume testicular dentro da normalidade e sem sinais clínicos de obstrução. As biópsias foram realizadas na Instituição, por via percutânea com agulha grossa (18G), acoplada a uma seringa de 20 mL e um porta-seringas tipo Cameco, sob regime ambulatorial, com anestesia local (bloqueio do cordão espermático com lidocaína sem vasoconstritor) ou anestesia intravenosa com propofol. As amostras foram divididas, sendo uma parte colocada na solução fixadora de Bouin e enviadas para análise num

laboratório de histopatologia credenciado pela Instituição (Patologia Cirúrgica e Citopatologia Ltda., Campinas, Brasil), e outra parte enviada para o laboratório de fertilização in vitro da Instituição para exame a fresco. Os achados histopatológicos revelando hipoespermatogênese, parada na maturação germinativa, Sertoli *cell-only*, ou hialinização confirmaram o diagnóstico de ANO [Esteves et al., 2011a].

3.5.8. Diagnóstico de ANO

No presente estudo, o diagnóstico de ANO por falência espermatogênica foi baseado primariamente no julgamento clínico de médicos urologistas especialistas em reprodução masculina da ANDROFERT. Tal veredito levou em consideração os achados da avaliação andrológica. Especificamente, ejaculados azoospermicos pós-centrifugação com volume e pH normais, uma história revelando a presença de alterações testiculares intrínsecas (por exemplo, criptorquidia, orquite, trauma/torção testicular, radioterapia, quimioterapia, cirurgia escrotal relevante), um exame físico revelando testículos de volume reduzido (<15 mL) associado à presença de ducto deferente palpável e epidídimos não ingurgitados, e exame hormonal, mostrando níveis séricos de FSH >7,6 UI/L e de testosterona total <350 ng/dL, foram indicativos de ANO. A presença de achados equívocos no exame físico, ultrassonografia escrotal revelando testículos hipotróficos associados ou não à disgenesia testicular (por exemplo, microlitíase testicular) também foi indicativa de ANO.

O estudo genético alterado, revelando síndrome de Klinefelter ou microdeleção do cromossomo Yq, na presença de ejaculados com volume e pH normais e ausência de espermatozoides na análise seminal pós-centrifugação, também foi considerado indicativo de ANO. Por fim, nos homens com ausência de achados dignos de nota na anamnese, FSH sérico e volume testicular normais, e sem sinais de obstrução ou problemas de coleta de sêmen, uma biópsia testicular diagnóstica com achados histológicos compatíveis com hipoespermatogênese, parada de maturação germinativa, hialinização tubular, e presença de somente células de Sertoli, confirmou o diagnóstico de ANO.

Independentemente do diagnóstico clínico, todos os pacientes incluídos tiveram uma biópsia testicular realizada durante a micro-TESE para confirmar, histologicamente, a ANO.

3.6. Estimulação Hormonal

3.6.1. Consentimento Informado

A terapia de estimulação hormonal foi oferecida a todos os pacientes elegíveis. Para a tomada de decisão, os pacientes foram notificados pelos médicos assistentes de que o uso de gonadotrofinas exógenas na ANO é considerada fora das diretrizes das indicações homologadas para o fármaco na bula, e que poucas evidências (baseadas em pequenas séries de casos) apoiam o uso de tal tratamento como benéfico para estimular a espermatogênese e aumentar as taxas de sucesso na recuperação de espermatozoides. Os pacientes foram informados sobre a segurança do uso de gonadotrofinas em geral e os potenciais efeitos adversos divulgados no folheto do medicamento para os pacientes, incluindo, mas não limitado, à dor no local da injeção, reações alérgicas, ginecomastia, mastalgia e cefaleia.

Os pacientes foram informados de que os custos relacionados ao uso de tais medicamentos são tipicamente elevados, variando de acordo com a duração do tratamento, posologia e dosagem. Além disso, discutiu-se que drogas orais de custo relativamente baixo (por exemplo, moduladores seletivos do receptor de estrogênio e inibidores da aromatase) também têm sido utilizadas, fora das indicações de bula, na ANO. Ainda assim, foram informados de que as evidências sobre sua eficácia e segurança são igualmente escassas, e que não existem estudos comparativos entre gonadotrofinas urinárias e recombinantes quanto à efetividade no contexto da ANO. Salientou-se que o protocolo deste estudo visou o uso exclusivo de gonadotrofinas recombinantes. Os médicos assistentes explicaram, em termos leigos, a plausibilidade biológica do uso de gonadotrofinas exógenas no contexto da ANO. Eles acrescentaram que, ao contrário da medicação oral mencionada acima, as gonadotrofinas exógenas aumentam a produção de TIT e reduzem os níveis de FSH, oferecendo vantagens potenciais sobre a medicação oral para a função das células de Sertoli e estimulação da espermatogênese.

Os pacientes também foram informados de que a duração do tratamento seria de pelo menos três meses, podendo ser maior, dependendo das características clínicas e da resposta individual. Eles foram orientados de que a via de administração do medicamento seria subcutânea com dispositivo de autoaplicação e que, dada a meia-vida do(s) medicamento(s), as injeções precisariam ser administradas duas vezes por semana. Por fim, eles receberam uma estimativa bruta dos custos potenciais do tratamento com base no valor de mercado das

gonadotrofinas, a fim de auxiliar na tomada de decisão informada. Em suma, a decisão de ser tratado com gonadotrofinas exógenas antes da micro-TESE ou prosseguir diretamente para a micro-TESE sem terapia hormonal ficou a critério de cada paciente.

3.6.2. Protocolo Terapêutico da Estimulação Hormonal e Seguimento

3.6.2.1. Estimulação Hormonal

Após assinatura do consentimento informado, os pacientes que optaram pela modulação hormonal iniciaram o tratamento com a administração da gonadotrofina coriônica humana recombinante (rec-hCG; coriogonadotropina alfa, 250 mcg/0,5 mL caneta pronta para uso, Merck, Brasil), com a dose de 80 mcg, aplicada por via subcutânea, duas vezes por semana (**Figura 1**).

A dose de 80 mcg corresponde a aproximadamente 2080 UI da droga. Para definir a dose, o botão de ajuste do dispositivo é girado suavemente no sentido horário até que oito “cliques” audíveis sejam alcançados. Os pesquisadores estimaram que cada clique audível correspondia a aproximadamente dez mcg da droga (~260 UI), considerando que o dispositivo contém 250 mcg de rec-hCG e o botão de ajuste possui 25 cliques audíveis quando girado até o final. A primeira injeção foi administrada na Instituição, pelo médico ou enfermeira, ao redor da área umbilical. O profissional ensinou cada paciente a autoadministrar o medicamento fracionado usando o dispositivo. Depois da primeira aplicação, os pacientes passaram a utilizar a injeção em casa, sendo instruídos a armazenar o dispositivo de aplicação contendo a droga num ambiente refrigerado (2-8°C), até que todo o seu conteúdo fosse utilizado. Cada dispositivo fornece de uma a seis doses; portanto, três semanas corresponderam ao período mais longo que um dispositivo foi mantido em uso. Importante ressaltar que o dispositivo contendo a coriogonadotrofina alfa é de uso único, de acordo com o fabricante, e indicado para mulheres para tratamento de infertilidade (**Anexo 4**). A bioequivalência entre as doses fracionadas utilizadas e monodoses equivalentes não está estabelecida pelo fabricante. Os investigadores também estavam cientes de que o acondicionamento da coriogonadotropina alfa no dispositivo era desprovido de conservantes (por exemplo, agente bacteriostático); assim, a ausência de contaminação microbiana (isto é, esterilidade) na configuração de uso múltiplo da caneta não poderia ser garantida.

3.6.2.2. Seguimento

Durante o tratamento, as dosagens hormonais foram realizadas periodicamente. Precisamente, os níveis séricos de FSH, LH, estradiol (E2), testosterona total (TT), e testosterona livre (TL) foram monitorados a cada três ou quatro semanas usando o método descrito anteriormente (vide "exames hormonais").

A análise do sêmen foi realizada três meses após o início do tratamento, conforme descrita na seção “análise seminal” e, em seguida, a cada quatro semanas nos pacientes que continuaram a terapia por mais de três meses (**Figura 1**). No caso de se encontrar espermatozoides viáveis em qualquer análise seminal durante o tratamento, seria recomendada a criopreservação de gametas conforme protocolo do serviço [Esteves & Varghese, 2012]. Nesses casos, a opção de continuar ou não a modulação hormonal seria decidida de forma compartilhada entre médico e paciente. Em tais casos, entretanto, a micro-TESE não seria mais necessária, e tais indivíduos seriam excluídos do estudo.

3.6.2.3. Ajustes Terapêuticos

A dose de rec-hCG foi ajustada, se necessário, de acordo com os níveis séricos de TT obtidos em cada visita de seguimento, a fim de manter tais níveis entre 350 e 900 ng/dL, preferencialmente entre 500 e 900 ng/dL (**Figura 1**). Os ajustes foram geralmente realizados com doses fracionadas de 20-40 microgramas (520-1.080 UI). A dose máxima utilizada por injeção foi de 250 mcg (6.500 UI). Nos casos em que o nível alvo de testosterona sérica não tenha sido alcançado com a dose máxima, o tratamento foi continuado usando a dose semanal máxima de 250 mcg por um mínimo de três meses, sem que nenhum aumento adicional na dosagem de rec-hCG fosse realizado. Por outro lado, nos casos em que os níveis de TT excederam o limite de 900 ng/dL, a dose de rec-hCG foi reduzida e nova avaliação hormonal realizada em aproximadamente 4 semanas.

Nos casos em que o nível sérico de FSH atingiu valores abaixo de 1,5 UI/L durante o tratamento com o rec-hCG, iniciou-se suplementação com FSH recombinante (rec-FSH; folitropina alfa, 300 UI/0,5 mL, caneta multidose pronta para uso, Merck, Brasil) (**Figura 1**). Uma dose fixa de 150 UI, três vezes por semana, foi prescrita concomitantemente ao uso de rec-hCG, por pelo menos três meses. A primeira injeção foi administrada na Instituição, pelo médico ou enfermeira, no mesmo dia da aplicação do hCG, ao redor da área umbilical. Depois da primeira dose, os pacientes foram instruídos a autoadministrar o medicamento. O dispositivo

possui um indicador de dose que permite ao usuário definir a dose a ser utilizada em UI. Para tal, basta girar suavemente o botão de ajuste de dose no sentido horário. Após a injeção, os pacientes foram instruídos a armazenar o dispositivo em ambiente refrigerado (2-8°C) até que todo o seu conteúdo fosse utilizado. Cada dispositivo fornece duas doses com base na dose fixa de 150 UI prescrita; portanto o período mais longo que uma caneta foi mantida em uso foi de uma semana. Depois de aberta, a caneta multidoses de FSH recombinante pode ser conservada até o máximo de 28 dias a uma temperatura igual ou inferior a 25°C. Segundo o fabricante, foi demonstrada bioequivalência entre doses equivalentes da apresentação monodose e do dispositivo multidoses (**Anexo 5**). O FSH recombinante possui indicação de bula para estimular a espermatogênese de homens com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito ou adquirido, associado ao uso concomitante de hCG. Ainda assim, não há indicação de bula para homens com ANO causada por deficiência testicular primária.

Um inibidor de aromatase (anastrozol, 1mg, Eurofarma ou AstraZeneca, Brasil) foi adicionado, mesmo na ausência dessa indicação do medicamento em bula, na dose de 1mg ao dia, a qualquer momento durante o curso do tratamento, se os níveis de E2 excedessem 50 pg/mL ou a razão TT (ng/dL) e E2 (pg/mL) (relação TT/E2) ficasse menor que 10 (**Figura 1**). O inibidor de aromatase foi administrado por via oral em dose fixa para manter os níveis de estradiol abaixo de 50 pg/mL e/ou relação TT/E2 >10. Para esses pacientes, as enzimas hepáticas (ou seja, alanina transaminase, aspartato transaminase e gama-glutamil transferase) foram verificadas mensalmente devido ao metabolismo hepático da droga e à potencial hepatotoxicidade. O uso de anastrozol foi imediatamente descontinuado se quaisquer sinais de elevação das enzimas hepáticas fossem observados. O anastrozol é um inibidor seletivo da aromatase não esteroide que inibe a conversão da androstenediona em estrona e estradiol nos tecidos periféricos, reduzindo significativamente as concentrações séricas de estradiol. Em adultos, o medicamento é indicado como tratamento adjuvante do câncer de mama avançado com receptor hormonal positivo nas mulheres na pós-menopausa [[Cuzick et al.,2010](#)].

O período mínimo de estimulação hormonal foi de 3 meses, e caso o paciente mantivesse quadro de azoospermia após este período, a decisão entre realizar a recuperação espermática por micro-TESE ou seguir por mais tempo com a estimulação hormonal era compartilhada entre médico e paciente. Os pacientes eram esclarecidos da não obrigatoriedade de atingir níveis séricos de TT entre 500 e 900 ng/dL como critério para realização da micro-TESE, e que o objetivo principal da estimulação hormonal seria a estimulação da produção da testosterona intratesticular, a fim de propiciar condições fisiológicas ideais para a espermatogênese por um

período correspondente a um ciclo germinativo completo, que dura nos seres humanos cerca de 72 dias [Holstein et al., 2003].

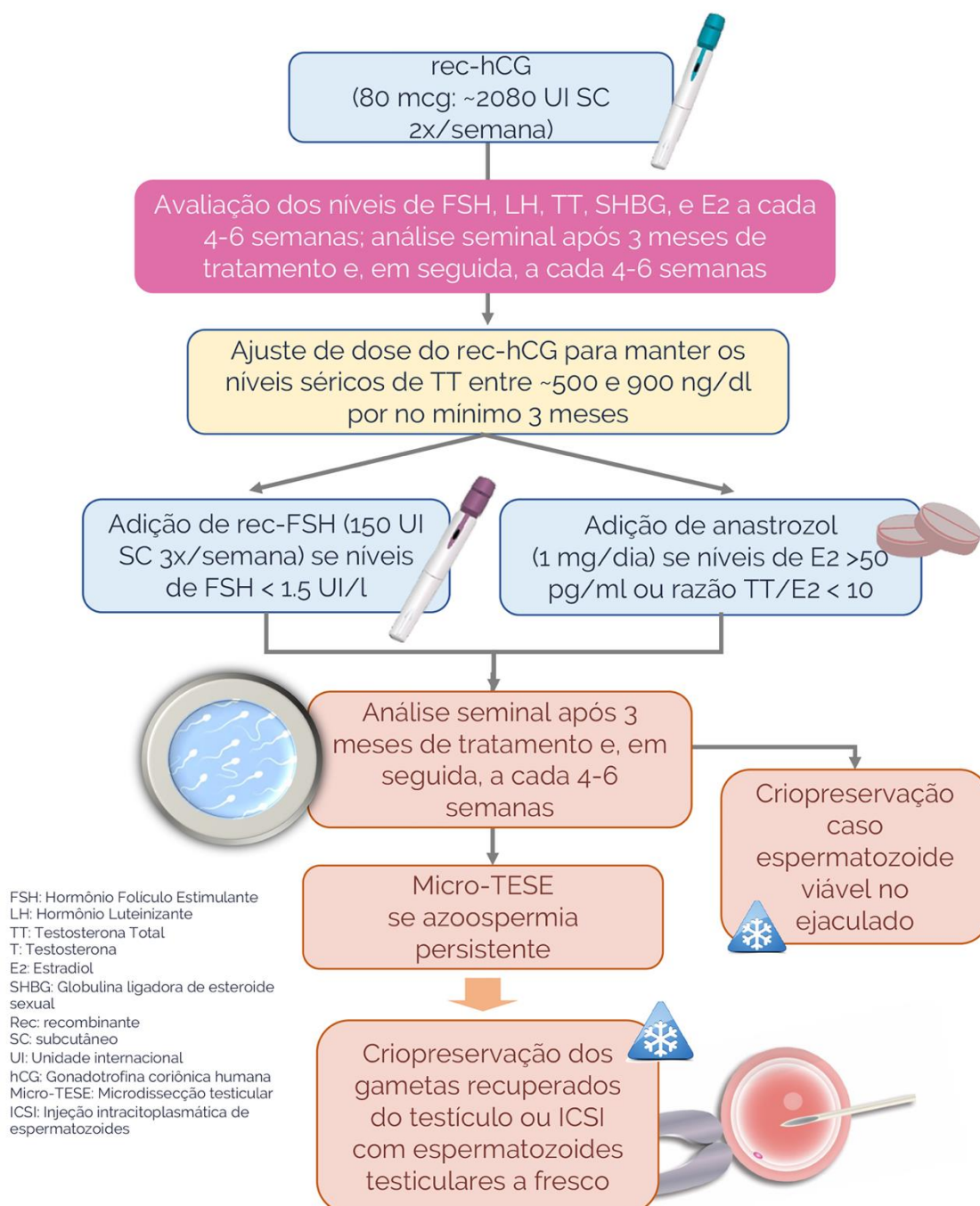


Figura 1. Regime terapêutico utilizado no presente estudo.

3.6.3. Registro de Eventos Adversos

As reações adversas suspeitas de terem surgido a partir da estimulação hormonal foram relatadas. Especificamente, em cada consulta de acompanhamento, os pacientes foram questionados se alguma das seguintes reações adversas foram observadas: reações alérgicas sistêmicas ou locais relevantes (dor prolongada, hematoma, inchaço, coceira, exantema), ginecomastia, mastalgia, cefaléia persistente, orquialgia, orquite e inchaço escrotal. Eventual ganho de peso não foi registrado como efeito adverso.

3.7. Micro-TESE

A extração de espermatozoides foi realizada pela técnica de microdissecção testicular (micro-TESE), conforme descrito por Schlegel [Schlegel, 1999] e modificada por Esteves [Esteves, 2011b]. Os procedimentos foram realizados no centro cirúrgico da Instituição (**Figura 2**), em caráter ambulatorial, por urologistas especializados em reprodução masculina e com mais de dez anos de experiência em microcirurgia. Via de regra, o cirurgião era assistido por um residente sênior (R5) da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.



Figura 2. Foto panorâmica do centro cirúrgico da ANDROFERT.

3.7.1. Considerações Pré-Operatórias

Os pacientes foram informados sobre as características do procedimento cirúrgico, possíveis complicações e o resultado esperado. Realizou-se avaliação pré-operatória cardiovascular e anestésica. Os pacientes foram orientados e solicitados a interromper o uso de qualquer medicamento contendo ácido acetilsalicílico ou anticoagulantes uma semana antes da

cirurgia. Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) específico autorizando a realização do procedimento cirúrgico.

3.7.2. Técnica Cirúrgica

Inicialmente, os pacientes foram submetidos à tricotomia escrotal, encaminhados à sala de cirurgia, e colocados em decúbito dorsal. Em seguida, o microscópio cirúrgico (modelo MC-M31, DF Vasconcelos, Brasil) foi posicionado e ajustado (**Figura 3 e Figura 4A**).



Figura 3. Visão panorâmica do microscópio cirúrgico e cirurgiões executando o procedimento de micro-TESE

Procedeu-se a aquisição de acesso venoso periférico e administração de antibiótico-profilaxia antimicrobiana perioperatória com 2,0g de cefazolina em dose única. A seguir, realizou-se anestesia intravenosa com propofol sob dose de indução de 3 a 4 mg/kg, seguido de administração de forma contínua, com auxílio de bomba de infusão, na dose de 60 a 100 mcg/kg/min. Os pacientes foram mantidos sob ventilação espontânea com máscara laríngea durante todo o procedimento, sendo fornecido 2L/min de O₂ a 100%. Baixa dose de opioide, como fentanil (1 a 2 mcg/kg) ou alfentanil (7 a 15 mcg/kg), foi introduzido por via intravenosa, logo antes de o cirurgião iniciar a incisão da pele. Após a antisepsia do sítio cirúrgico e colocação dos campos cirúrgicos estéreis, realizou-se incisão transversal no hemiescroto contendo o testículo escolhido para ser operado, utilizando-se magnificação de 6x. Via de regra, tal escolha baseou-se no volume testicular, sendo abordado o testículo de maior volume. Caso ambos os testículos apresentassem volume semelhante, o procedimento era iniciado pelo lado direito. A túnica vaginal foi aberta e o testículo exteriorizado. Uma solução de 15 mL de lidocaína 2% e bupivacaína 1% 1:1 v/v foi injetada ao redor do cordão espermático sob visão direta. Os vasos testiculares subalbugíneos foram identificados sob magnificação de 6x. O local

da incisão na túnica albugínea foi então marcado com auxílio de caneta marcadora de ponta fina, na região equatorial mais avascular do testículo, com intuito de evitar a secção dos vasos subalbugíneos.

A seguir, incisou-se amplamente a túnica albugínea, utilizando bisturi de lâmina nº 15, sob magnificação de 6 a 8 vezes (**Figura 4B**). A extensão da incisão era de aproximadamente 270 graus, para permitir ampla exposição do parênquima testicular. As bordas da albugínea no local da incisão foram clampeadas com pinças tipo Halsted e afastadas, permitindo a ampla exposição do parênquima testicular.

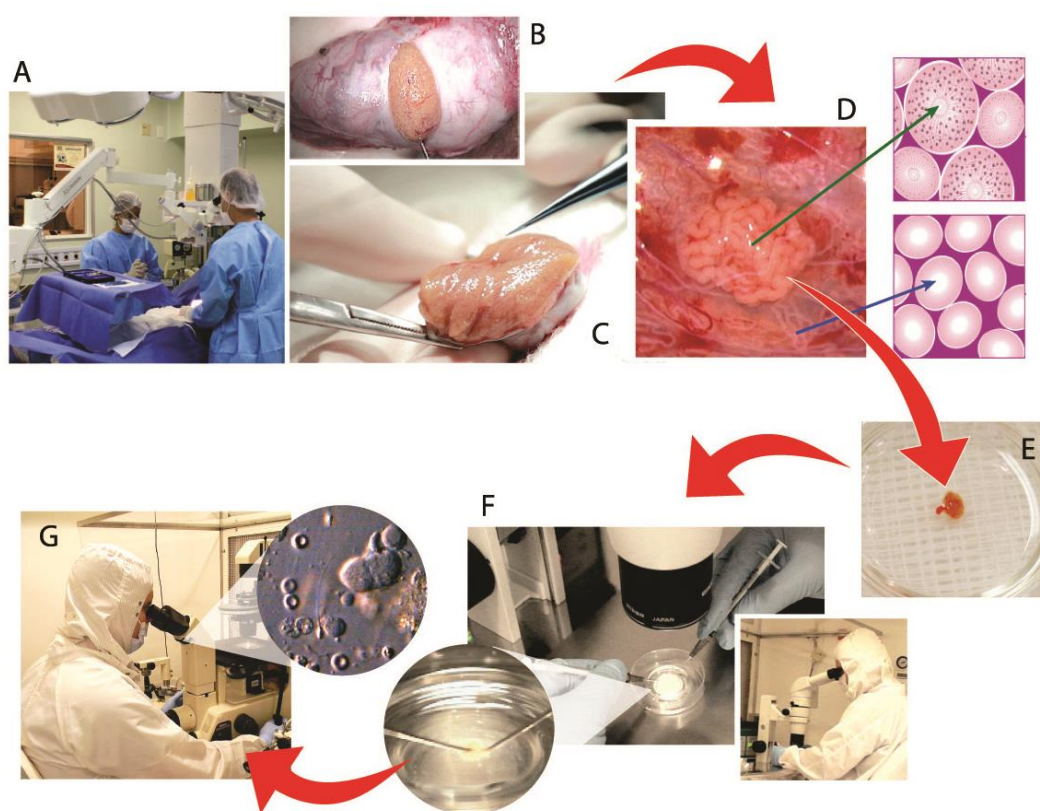


Figura 4. Etapas do procedimento de microdissecção testicular. A) Visão panorâmica do centro cirúrgico, microscópio e cirurgiões. B) Incisão da túnica albugínea. C) Dissecção microcirúrgica do parênquima testicular. D) Área focal contendo túbulos seminíferos de maior calibre no centro da foto. A ilustração no canto superior direito representa cortes transversais de túbulos seminíferos contendo espermatogênese ativa (seta verde) e outros apresentados ausência de células germinativas (seta azul). E) Placa de Petri contendo fragmento de parênquima testicular extraído. F) Dissecção mecânica dos túbulos seminíferos no estereomicroscópio. G) Análise da suspensão celular no microscópio invertido.

Procedeu-se a microdissecção dos túbulos seminíferos, utilizando-se pinça microcirúrgica, sob magnificação variando entre 10 e 25x (**Figura 4C**). A dissecção visou

identificar os túbulos seminíferos de maior calibre e, ao mesmo tempo, preservar os vasos sanguíneos intratesticulares. A microdissecção era realizada de forma sistemática, englobando os túbulos seminíferos superficiais e profundos, nos três polos testiculares, superior, médio e inferior.

Os túbulos seminíferos de maior calibre (**Figura 4D**) foram extraídos com auxílio de pinça microcirúrgica e colocados numa placa de Petri, contendo meio de cultura tamponado (**Figura 4E**). As amostras eram pesadas individualmente com auxílio de balança analítica de precisão (Metler Toledo, Brasil), e enviadas imediatamente ao laboratório de fertilização *in vitro* (FIV), anexo à sala cirúrgica, para processamento e análise (**Figura 4F e Figura 5**). No caso de apenas túbulos de calibre semelhante serem encontrados, biópsias aleatórias foram realizadas nos três polos testiculares. O peso total referente à soma de todos os espécimes extraídos foi registrado. Uma ou mais amostras medindo aproximadamente 3x3x3 mm foram extraídas, colocadas em fixador de Bouin, e enviadas para análise histopatológica.

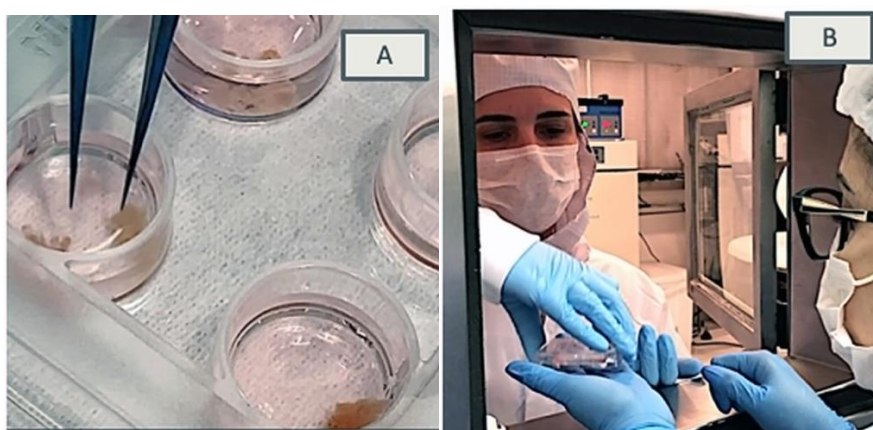


Figura 5. A) Fragmentos de parênquima testicular extraídos durante a microdissecção testicular. B) Entrega da placa contendo os fragmentos de parênquima testicular pela enfermeira à embriologista.

Quando necessário, a diatermia bipolar foi aplicada cuidadosamente durante a microdissecção para garantir a hemostasia. O cirurgião era informado prontamente pelos profissionais do laboratório de FIV sobre a existência ou não de espermatozoides no material extraído; de acordo com a avaliação inicial da amostra, a microdissecção era encerrada ou amostras adicionais eram coletadas (vide ‘processamento do parênquima testicular’). A saber, o procedimento era encerrado na presença de número adequado de espermatozoides para ICSI. Caso nenhum espermatozoide fosse encontrado ou a quantidade e/ou morfologia desses fosse julgada insuficiente para a ICSI, o testículo contralateral era microdissecado no mesmo tempo operatório, seguindo-se os mesmos passos operatórios já descritos. Ao final do procedimento e após revisão da hemostasia, a albugínea foi fechada com sutura contínua utilizando fio

inabsorvível de mononylon 5-0 (**Figura 6**). O testículo foi recolocado no hemiescroto e, em seguida, a túnica vaginal foi fechada com sutura contínua utilizando fio absorvível de catgut 4-0. Por fim, a túnica dartos e as camadas de pele foram fechadas com pontos separados e sutura contínua, respectivamente, utilizando fio absorvível de ácido poliglicólico 4-0 (**Figura 6**).

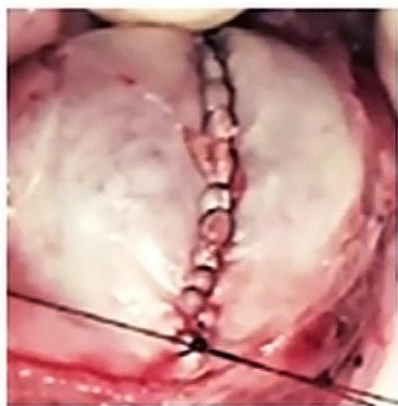


Figura 6. Aspecto final do testículo após a microdissecção testicular e sutura da túnica albugínea.

3.7.3. Processamento do Parênquima Testicular

O parênquima testicular extraído foi imediatamente processado no laboratório de FIV, localizado ao lado da sala cirúrgica. Os laboratórios de FIV da Instituição são certificados como salas limpa ISO 5 ou 6, com filtragem de partículas de ar e compostos orgânicos voláteis [Esteves & Bento, 2013; Esteves et al., 2013a] (**Figuras 7**).



Figura 7. Foto do Laboratório de Fertilização *In Vitro* da ANDROFERT.

Sob estereomicroscopia, os túbulos seminíferos foram primeiramente isolados, com o auxílio de agulhas finas acopladas a seringas de tuberculina estéreis, e lavados até que todo vestígio de sangue fosse removido [Verza Jr. & Esteves, 2019]. Posteriormente, a placa de Petri contendo os túbulos ainda intactos foi transferida para o microscópio invertido, onde o diâmetro

deles era registrado com auxílio de um sistema de captura de imagem (Octax, Alemanha). O cirurgião era prontamente informado sobre o diâmetro do túbulo de maior calibre. Em geral, quanto maior o calibre do túbulo, maior a chance de haver espermatogênese ativa [Ashraf et al., 2013]; portanto, o conhecimento sobre o diâmetro dos túbulos poderia orientar o cirurgião durante a micro-TESE.

Dois embriologistas trabalharam simultaneamente no processamento do parênquima testicular extraído. Sob estereomicroscopia, um dos profissionais rompia mecanicamente a parede dos túbulos seminíferos, para permitir o extravasamento de seu conteúdo celular, com auxílio de seringas agulhadas de tuberculina (**Figura 4F**). A suspensão celular obtida era examinada pelo segundo profissional à procura de espermatozoides, com auxílio do microscópio invertido (**Figura 4G**). Pelo fato de vários espécimes serem, via de regra, extraídos, o processamento simultâneo do material por dois profissionais visa aumentar a eficiência do processo, pois o cirurgião recebe de forma mais rápida a informação sobre a existência ou não de espermatozoides no material examinado. O cirurgião era prontamente informado no caso de espermatozoides serem encontrados. As suspensões contendo espermatozoides testiculares eram processadas para ICSI ou criopreservadas para uso futuro. A **Figura 8** ilustra sob a forma de um mapa visual o procedimento de micro-TESE como realizado no presente estudo.



Figura 8. Mapa visual da microdissecção testicular (vide texto explicativo).

Nas amostras positivas para espermatozoides, a motilidade espermática foi registrada, antes e depois da incubação com a pentoxifilina, um estimulante da motilidade espermática [Esteves et al., 1998; Esteves et al., 2007]. Caso apenas espermatozoides imóveis fossem encontrados, tal informação era registrada. Por outro lado, nos casos em que nenhum espermatozoide tenha sido encontrado após exame metuculoso da suspensão celular, procedeu-se à digestão enzimática das suspensões celulares com solução de colagenase, conforme protocolo padrão do serviço [Esteves & Varghese, 2012; Verza Jr. & Esteves, 2019], e a busca por espermatozoides era repetida. O procedimento de micro-TESE foi considerado positivo, ao encontrar qualquer número de espermatozoides. Por outro lado, a micro-TESE foi considerada negativa na ausência completa de espermatozoides após processamento mecânico e enzimático do parênquima testicular e avaliação metuculosa da suspensão celular. A presença de células redondas ou alongadas sugestivas de espermátides foi computada como resultado negativo.

3.7.4. Análise Histopatológica

As amostras de biópsia testicular colhidas durante a micro-TESE foram analisadas por patologistas com experiência no trato geniturinário num serviço externo (Patologia Cirúrgica e Citopatologia Ltda., Campinas, Brasil). Os espécimes foram processados, e os cortes histológicos corados pela método hematoxilina-eosina [Tang et al., 2022]. Em cada paciente, o número total de cortes transversais de túbulos seminíferos disponíveis para análise foi registrado. As amostras foram classificadas de acordo com o padrão histológico predominante.

O ‘padrão predominante’ foi definido como o padrão histológico observado em mais da metade dos cortes transversais dos túbulos seminíferos analisados [McLachlan et al., 2007; Punjani et al., 2021]. A classificação histológica incluiu cinco padrões de espermatogênese já estabelecidos, do mais avançado para o menos avançado: (i) espermatogênese normal, (ii) hipoespermatogênese, (iii) parada de maturação espermatogênica (precoce ou mais avançada), (iv) aplasia de células germinativas (síndrome ‘apenas células de Sertoli’) e (v) esclerose tubular [Cerilli et al., 2010; Dohle et al., 2012].

A espermatogênese normal foi definida como a presença de todos os estágios germinativos, ou seja, espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozoides, sem que houvesse declínio distinto em nenhuma dessas linhagens celulares. Hipoespermatogênese (HIPO) foi definida como a presença de todos os

estágios de células germinativas descritas acima, porém com uma redução evidente nas linhagens celulares. A parada de maturação germinativa (do inglês MA, *maturation arrest*) foi definida como a interrupção da espermatogênese em qualquer nível, desde a espermatogônia até a espermátide. Em tais casos, categorizou-se o tipo de parada de maturação em ‘precoce’ e ‘mais avançada’. A parada de maturação precoce foi definida como padrão predominante composto por espermatogônias ou espermátócitos primários, e ‘tardia’ como padrão predominante composto por espermátócitos secundários ou espermátides [Cerilli et al. 2010]. Por outro lado, a aplasia germinativa foi definida como a completa ausência de células germinativas no interior dos túbulos seminíferos e, portanto, presença de somente células de Sertoli (SCO). Por fim, a esclerose tubular foi definida como a ausência completa de qualquer linhagem celular nos túbulos seminíferos [Dohle et al., 2012]. No presente estudo, o diagnóstico histológico de ANO foi definido pela presença dos seguintes padrões histológicos, puros ou combinados: HIPO, MA, SCO, e hialinização tubular.

3.7.5. Cuidados e Seguimento Pós-Operatório

Após a micro-TESE, os pacientes permaneceram na Instituição com cuidados contínuos por cerca de 3-4 horas. Antes da alta, foram descartados sinais de edema escrotal, sangramento e hematoma. Os pacientes foram instruídos a realizar compressa de gelo na região escrotal e repouso no leito nas primeiras 48 horas de pós-operatório. Foram também orientados a fazer dieta leve nesse período e lavar o sítio cirúrgico com água e sabão a partir de 24 horas após o procedimento. Todos os pacientes operados foram instruídos a usar um suspensório escrotal por duas semanas, substituir o curativo da incisão na pele diariamente por aproximadamente cinco dias, e abster-se de relações sexuais e atividades físicas por duas semanas. Anti-inflamatórios não-esteroides e analgésicos comuns foram prescritos por via oral para controle da dor e do inchaço por cinco dias. Antibiótico também foi prescrito no pós-operatório (levofloxacino, 500 mg 1x/dia) por 7 dias. Normalmente, era oferecida licença médica de 3 a 7 dias. Os pacientes foram informados de que edema e equimose seriam observados no sítio cirúrgico, e que iriam resolver espontaneamente na maioria dos casos em até duas semanas de pós-operatório. Visitas pós-operatórias de rotina foram realizadas uma e quatro semanas após a operação, e as complicações dela decorrentes foram registradas e tratadas.

3.8. Processamento e Análise dos Dados

Para a coleta de dados, foi elaborada uma planilha Excel contendo as variáveis de interesse. Códigos foram utilizados para substituir a identificação dos pacientes. Os seguintes dados demográficos foram coletados: idade do paciente, índice de massa corporal (IMC), duração da infertilidade, tabagismo, causa da ANO, volume testicular, níveis séricos hormonais basais (FSH, LH, E2, TT, TL, relação TT/E2), presença de varicocele clínica e história de correção de varicocele. Os dados de tratamento incluíram o uso de gonadotrofinas pré-micro-TESE, necessidade de ajuste da dose de hCG recombinante, suplementação com FSH recombinante, uso de inibidor de aromatase, dose total de hCG recombinante utilizada, dose total de FSH recombinante utilizada, duração do tratamento, níveis séricos dos hormônios sexuais antes da micro-TESE (FSH, LH, E2, TT, TL, relação TT/E2), efeitos adversos no grupo de pacientes que receberam gonadotrofinas. Por fim, os dados da micro-TESE incluíram: histopatologia testicular, lateralidade da micro-TESE, quantidade de tecido extraído, sucesso na extração de espermatozoides, e complicações intra- ou pós-operatórias.

A planilha foi preenchida por um dos pesquisadores (APPA) a partir dos dados extraídos do prontuário eletrônico de cada paciente elegível. Os prontuários eletrônicos permanecem armazenados no software de gerenciamento de dados da Instituição (Clinisys®, Brasil). A planilha supracitada foi validada pelo supervisor do estudo (SCE). Tal planilha, com dados anonimizados, foi enviada a um serviço de suporte estatístico contratado para a análise dos dados terceirizado (Statistika Consultoria, Campinas, Brasil) para validação e análise estatística. A validação dos dados foi realizada para valores implausíveis causados por erros de entrada de dados ou valores ausentes, e as incongruências foram resolvidas com os pesquisadores. Os prontuários dos pacientes foram consultados sempre que necessário para dirimir dúvidas.

Foram excluídos os pacientes com valores implausíveis não resolvidos ou valores ausentes críticos que impediriam a análise dos desfechos primários e secundários. Pelo fato da terapia hormonal utilizada no presente estudo ser baseada no uso do hCG, cujo objetivo primário é aumentar os níveis de TIT, e consequentemente, os níveis séricos de T, e secundariamente, reduzir os níveis basais de FSH e LH circulantes, os dados referentes aos valores de testosterona, FSH e LH, basais e ao final da terapia hormonal, foram processados para produzir as seguintes variáveis de interesse: diferença entre os níveis de TT pós- e pré-tratamento (denominada ‘delta T’), diferença entre os níveis de FSH pós- e pré-tratamento (denominada ‘delta FSH’), e diferença entre os níveis de LH pós- e pré-tratamento (denominada

‘delta LH’). Nenhum outro ajuste de dados foi feito. Desfechos relativos aos resultados da ICSI utilizando espermatozoides testiculares dos pacientes estudados não foram computados no presente estudo.

3.9. Análise Estatística

3.9.1. Hipótese Nula sobre o Desfecho Primário

A hipótese nula é que a taxa de sucesso na recuperação de espermatozoides não difere entre os pacientes tratados com gonadotrofinas e os não-tratados.

3.9.2. Cálculo do Tamanho Amostral

Com base em um estudo anterior do grupo de pesquisadores, a taxa de sucesso na recuperação de espermatozoides por micro-TESE numa população não-selecionada de 365 homens com ANO foi de 41,4% [Esteves et al., 2014]. A taxa de sucesso na recuperação de espermatozoides por micro-TESE relatada após tratamento hormonal utilizando modulador seletivo de receptor de estrogênio ou hCG em um estudo observacional que incluiu uma população não selecionada de 612 pacientes com ANO foi de 57% (vs. 33,6% nos pacientes não tratados) [Hussein et al., 2013]. Em outra série de tamanho semelhante, nenhuma diferença significativa foi observada nas taxas de recuperação de espermatozoides por micro-TESE entre pacientes com ANO tratados ou não (52% vs. 56%); neste estudo, o tratamento foi realizado principalmente com moduladores seletivos de receptores de estrogênio [Reifsnnyder et al., 2012]. Os investigadores desconhecem qualquer estudo comparando o sucesso da recuperação de espermatozoides por micro-TESE em pacientes com ANO e hipogonadismo submetidos ou não a modulação hormonal usando gonadotrofinas recombinantes exógenas (ou seja, rec-hCG isoladamente ou combinado com rec-FSH).

Com base nas taxas de sucesso descritas acima, estimamos que um tamanho amostral de 458 participantes (229 por grupo) ofereça 90% de chance de detectar, como significativo ao nível de 5%, um aumento na taxa de sucesso da recuperação de espermatozoides de 42% no grupo controle (não-tratado) para 57% no grupo experimental (tratado).

3.9.3. Análises Descritiva e Comparativa

Os dados categóricos foram descritos pelo número de casos e porcentagens. Os dados contínuos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil 25%-75%, pois as variáveis contínuas não apresentaram distribuição normal. Os dados categóricos e contínuos foram analisados por meio do teste Qui-quadrado de Pearson e teste de Wilcoxon. A significância estatística foi estabelecida em um valor de $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados usando JMP® PRO 13 (SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, EUA).

3.9.4. Regressão Logística

Análises de regressão logística generalizada foram utilizadas para examinar a associação entre as covariáveis do paciente e as taxas de sucesso na recuperação de espermatozoides, tanto na população total quanto no grupo de pacientes submetidos à estimulação hormonal. A variável dependente foi a presença de espermatozoides na micro-TESE, e as variáveis independentes foram os dados clínicos pré-operatórios, incluindo dados demográficos, perfil hormonal, etiologia da ANO, volume testicular, uso e características da estimulação hormonal, além dos resultados da histopatologia testicular. As variáveis independentes foram inseridas simultaneamente no modelo de regressão. Utilizou-se um modelo linear generalizado aplicando-se o método adaptativo LASSO (do inglês *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*). A regra de parada no procedimento LASSO foi baseada no critério de informação Akaike (AIC, do inglês *Akaike Information Criteria*) ajustado. Tal modelo penaliza as variáveis de menor relevância e evita que um número elevado de variáveis explicativas e correlacionadas tornem o modelo de regressão redundante [Tibshirani, 1996; Zou, 2006; Esteves et al., 2020]. No presente estudo, a natureza das análises de regressão foi de caráter associativo, destinada principalmente a esclarecer possíveis associações entre covariáveis e taxas de sucesso da recuperação de espermatozoides. Tais análises não objetivaram criar um modelo para prever o sucesso da recuperação de espermatozoides para novos dados.

Além disso, foram construídas curvas ROC (do inglês ROC, *receiver operating characteristics*) com as covariáveis identificadas como relevantes para prever o sucesso na recuperação de espermatozoides no grupo que recebeu modulação hormonal. O índice de Youden (estatística J de Youden) foi usado para selecionar o valor de corte previsto ideal, a fim de maximizar a diferença entre a taxa positiva verdadeira e a taxa positiva falsa. As análises foram realizadas no JMP® PRO 13 (SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Participantes

O estudo incluiu um total de 616 pacientes consecutivos que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão. Entre eles, 325 pacientes (53%) foram submetidos a micro-TESE sem estimulação hormonal prévia (não tratados), enquanto 291 pacientes (47%) tiveram o procedimento de recuperação de espermatozoides após receber pelo menos três meses de estimulação hormonal com gonadotrofinas (tratados) de acordo com o protocolo do estudo (Figura 9).

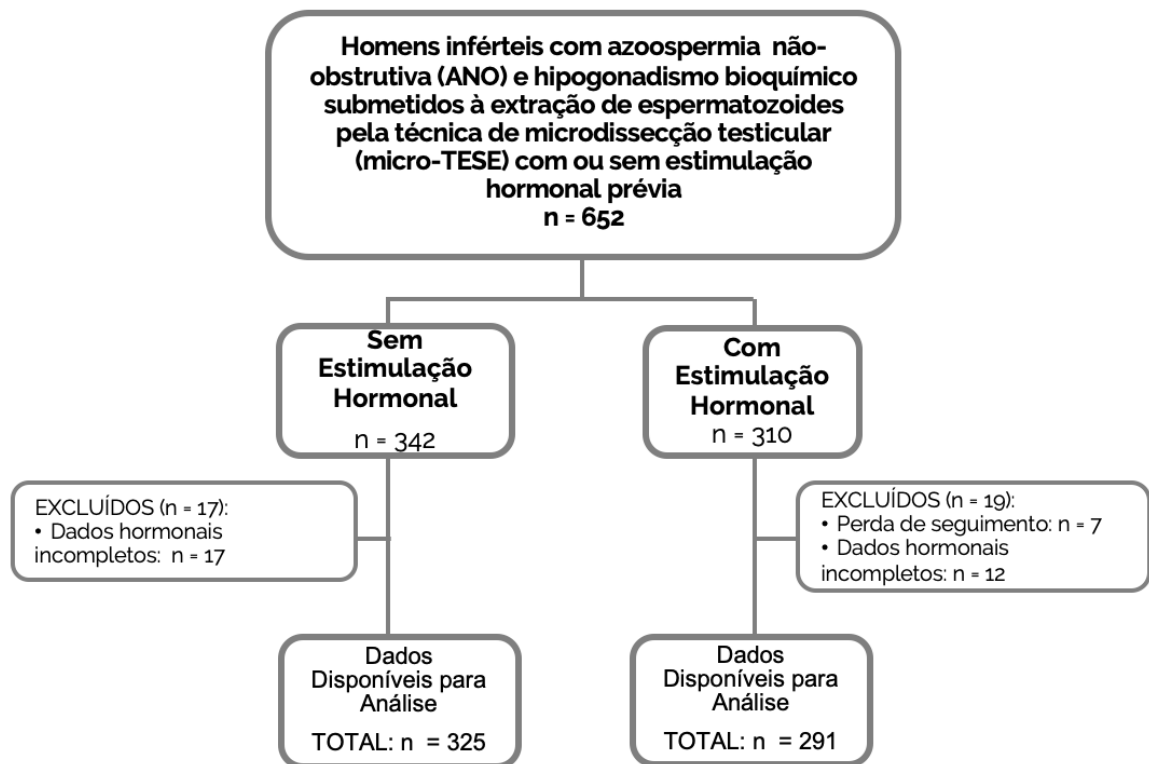


Figura 9. Fluxograma representando a população estudada.

4.2. Principais Resultados

A taxa geral de sucesso na recuperação espermática foi de 56,6% (349/616), sendo de 51,4% (167/325) no grupo não tratado e 62,5% (182/291) no grupo que recebeu estimulação hormonal com gonadotrofina pré-micro-TESE ($P=0,006$).

A **Tabela 1** apresenta as características da população estudada e as taxas de recuperação de espermatozoides, tanto gerais quanto estratificadas pelo uso ou não da estimulação hormonal. A população do estudo apresentou uma idade mediana (IQR) de 35 anos (32;39), um IMC mediano de 27,5 (24,8;30,9) e a grande maioria (90,1%) era não fumante. Os níveis basais médios de FSH e TT foram 12,3 UI/L (8,9-18,2) e 276,0 ng/dL (233,0;303,0), respectivamente, e o volume testicular mediano (esquerdo + direito) foi de 20,0 mL (16,0;27,0). Do total de 616 pacientes nesta coorte, 45,3% (279/616) tinham níveis normais de FSH (normogonadotrópico; $FSH < 12$ UI/L), enquanto 54,7% (337/616) tinham níveis elevados de FSH (hipergonadotrópico; $FSH \geq 12$ IU/L). A causa mais comum de ANO foi idiopática, enquanto um terço dos pacientes apresentavam varicocele clínica. Resultados de histopatologia testicular de biópsias feitas durante micro-TESE mostraram uma distribuição semelhante de pacientes com aplasia de células germinativas (56% Sertoli *cell-only*) e com sinais de espermatogênese (44% parada de maturação ou hipoespermatogênese). A maioria dos pacientes com parada de maturação exibiu células germinativas com desenvolvimento interrompido em estágio tardio.

Em geral, os pacientes que receberam estimulação hormonal antes da micro-TESE apresentaram maior IMC, menor volume testicular, níveis basais de FSH e estradiol mais elevados e níveis basais de testosterona circulante (total e livre) mais baixos. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos em termos de idade, duração da infertilidade, níveis basais de LH ou resultados da histopatologia testicular. Além disso, a quantidade de tecido testicular extraído durante os procedimentos de micro-TESE foi semelhante entre os dois grupos. As variáveis relevantes não apresentaram valores faltantes (**Anexo 6**). Deve-se notar que o conjunto de dados não forneceu informações sobre os motivos pelos quais alguns pacientes optaram por não usar estimulação hormonal.

Tabela 1. Características basais da população total submetida à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE), e estratificada pelo uso ou não da estimulação hormonal. Valores representam medianas (intervalo inter-quartis) ou n (%).

	Todos os pacientes (n=616)	Sem estimulação hormonal (n=325)	Com estimulação hormonal (n=291)	P-valor
Idade (anos)	35,0 (32;39)	35,0 (32;39)	35,0(33;39)	0,30 ^a
IMC (kg/m²)	27,5 (24,8;30,9)	26,8 (24,4;30,4)	28,0 (25,1;31,2)	0,006^a
Duração de infertilidade (meses)	57,6 (38,4;96,0)	56,8 (38,1;95,9)	57,9 (38,4;99,2)	0,20 ^a
Tabagismo	61 (9,9)	28 (9,6)	33 (10,1)	0,64 ^b
Etiologia:				0,89 ^b
<i>Idiopático</i>	431 (70,0)	231 (71,1)	200 (68,7)	
<i>Criptorquidia</i>	94 (15,3)	49 (15,1)	45 (15,5)	
<i>Genética‡</i>	35 (5,7)	15 (4,6)	20 (6,9)	
<i>Pós-orquite</i>	23 (3,7)	13 (4,0)	10 (3,4)	
<i>Pós-gonadotoxina</i>	29 (4,7)	15 (4,6)	14 (4,8)	
<i>Pós-trauma</i>	4 (0,6)	2 (0,6)	2 (0,7)	
Volume testicular (mL):				
<i>Direito</i>	10,0 (8,0;12,0)	11,0 (8,0;13,0)	10,0 (7,0;12,0)	0,006^a
<i>Esquerdo</i>	10,0 (8,0;14,0)	11,0 (8,0;12,0)	10,0 (8,0;15,0)	0,09 ^a
<i>Total (Direito + Esquerdo)</i>	20,0 (16,0;27,0)	22,0 (16,0;27,0)	19,0 (14,0;27,0)	0,003^a
Níveis hormonais basais:				
<i>FSH (UI/mL)</i>	12,3 (8,9;18,2)	12,0 (8,6;15,4)	13,6 (9,1;21,6)	0,0003^a
<i>LH (UI/mL)</i>	6,2 (5,0;8,9)	6,0 (5,0;8,0)	6,2 (4,7;9,2)	0,35 ^a
<i>E2 (pg/mL)</i>	26,0 (20,0;31,0)	25,0 (18,0;30,0)	28,0 (22,0;34,0)	<0,0001^a
<i>TT (ng/dL)</i>	276,0 (233,0;303,0)	278,0 (252,0;312,0)	271,0 (211,2;300,0)	0,0003^a
<i>Relação TT/E2</i>	10,1 (8,1;13,4)	11,6 (9,2;15,0)	9,1 (7,4;11,3)	<0,0001^a
<i>TL (ng/dL)</i>	6,9 (6,0;7,2)	7,0 (6,0;8,0)	6,0 (5,0;7,0)	<0,0001^a
Varicocele:	193 (31,3)	90 (27,7)	103 (35,4)	0,04^b
<i>Tratada</i>	84 (13,6)	35 (10,8)	49 (16,8)	0,09 ^b
Histopatologia testicular‡:				0,07 ^b
<i>Sertoli cell-only†</i>	345 (56,0)	193 (59,4)	152 (52,2)	
<i>Parada de maturação</i>	162 (26,3)	80 (24,6)	82 (28,2)	
<i>Precoce</i>	15 (2,4)	5 (15,4)	10 (3,4)	
<i>Tardia</i>	147 (23,8)	75 (23,1)	72 (24,7)	
<i>Hipoespermato gênese</i>	109 (17,7)	52 (16,0)	57 (19,6)	
Micro-TESE:				
Lateralidade:				0,015^b
<i>Direito</i>	155 (25,2)	68 (21,0)	87 (29,9)	
<i>Esquerdo</i>	106 (17,2)	53 (16,3)	53 (18,2)	
<i>Bilateral</i>	355 (57,6)	204 (62,8)	151 (51,9)	
Tecido extraído (mg):	89,6 (72;127,6)	89,6 (72,0;121,6)	94,4 (72,0;142,4)	0,26 ^a
Taxa de recuperação espermática:	349 (56,6)	167 (51,4)	182 (62,5)	0,006^b

E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; E2: estradiol; IMC: índice de massa corporal; UI: unidades internacionais; LH: hormônio luteinizante; micro-TESE: microdissecção testicular; TT: testosterona total; TL: testosterona livre.

^aTeste de Wilcoxon; ^bTeste de Pearson χ^2 .

‡Casos genéticos incluídos: 21 casos de azoospermia por microdeleção no cromossomo Y fator c (AZFc), 14 casos de síndrome de Klinefelter (12 não-mosaicos e 2 com mosaicismo). Desses, 9 pacientes com microdeleção no cromossomo Y e 12 com síndrome de Klinefelter receberam terapia com gonadotrofina, enquanto 12 pacientes com microdeleção do cromossomo Y e 2 com síndrome de Klinefelter não receberam.

‡Biópsias obtidas durante micro-TESE.

†Incluído hialinização (Total: 3 casos; Grupo sem tratamento: 0 casos; Grupo tratado: 3 casos).

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

A **Tabela 2** apresenta as características da população geral dividida pelo resultado da recuperação de espermatozoides. De forma geral, os pacientes que tiveram espermatozoides coletados por meio de micro-TESE apresentaram níveis basais mais baixos de FSH e LH e uma frequência mais alta de relatórios de histopatologia testicular indicando sinais de espermatogênese, ou seja, parada de maturação ou hipoespermatogênese: 60,4% vs. 22,5%; $P < 0,0001$ em comparação com pacientes com falha na recuperação espermática. Além disso, mais pacientes que obtiveram sucesso na recuperação espermática receberam estimulação hormonal antes do micro-TESE do que aqueles que falharam nas recuperações (52,1% vs. 40,8%, $P = 0,0006$).

No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à idade, duração da infertilidade, tabagismo, etiologia da ANO, volume testicular, níveis basais de E2 e testosterona (total e livre), diagnóstico de varicocele ou quantidade de tecido extraído durante micro-TESE. Se nenhum espermatozoide foi recuperado, o testículo contralateral foi microdissecado durante o mesmo procedimento. Consequentemente, todos os pacientes com falha na recuperação espermática tiveram ambos os testículos explorados, enquanto apenas 25,2% dos pacientes com sucesso na recuperação de espermatozoides foram submetidos a micro-TESE bilateral ($P < 0,0001$) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características da população total, submetida à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção (micro-TESE) e estratificado por resultado quanto à recuperação espermática. Os valores representam medianas (intervalo inter-quartis) ou n (%).

	Recuperação espermática positiva (n=349)	Recuperação espermática negativa (n=267)	P-valor
Idade (anos)	36 (32;39)	35 (33;39)	0,66 ^a
IMC (kg/m²)	27,1 (24,3;30,9)	27,6 (25,2;31)	0,29 ^a
Duração de infertilidade (meses)	36 (24;60)	36 (24;66)	0,31 ^a
Etiologia:			0,08 ^b
<i>Idiopático</i>	244 (69,9)	187 (70,0)	
<i>Criptorquidia</i>	57 (16,3)	37 (13,9)	
<i>Genética‡</i>	13 (3,7)	22 (8,2)	
<i>Pós-orquite</i>	15 (4,3)	8 (3,0)	
<i>Pós-gonadotoxina</i>	16 (4,6)	13 (4,9)	
<i>Pós-trauma</i>	4 (1,1)	0	
Volume testicular (mL):			
<i>Direito</i>	10 (8;14,2)	10 (8;12)	0,93 ^a
<i>Esquerdo</i>	10 (8;15)	10 (8;12)	0,66 ^a
<i>Total (Direito + Esquerdo)</i>	20 (15;27,5)	20 (16;24)	0,79 ^a
Níveis hormonais basais:			
<i>FSH (UI/L)</i>	11,0 (8,4;16)	14,3 (10,1;21,5)	<0,0001^a
<i>LH (UI/L)</i>	5,7 (4,7;8)	6,9 (5,1;10,6)	0,0004^a
<i>TT (ng/dL)</i>	278,0 (240,0;305,0)	276,0 (233,0;302,0)	0,38 ^a
<i>E2 (pg/mL)</i>	26,0 (20;31,5)	26,0 (21;30)	0,84 ^a
<i>TL (ng/dL)</i>	7,0 (6,0;7,1)	6,9 (6,0;7,5)	0,38 ^a
<i>Relação TT/E2</i>	10,1 (8,1;13,9)	10,1 (8,1;13,0)	0,59 ^a
Varicocele[§]:	84 (22,9)	109 (40,8)	0,55 ^b
<i>Tratada</i>	53 (15,2)	31 (11,6)	0,43 ^b
Histopatologia testicular[‡]:			<0,0001^b
<i>Sertoli cell-only†</i>	138 (39,5)	207 (77,5)	
<i>Parada de maturação</i>	102 (29,2)	60 (22,5)	
<i>Precoce</i>	8 (2,3)	7 (2,6)	
<i>Tardia</i>	94 (26,9)	53 (19,8)	
<i>Hipoespermato gênese</i>	109 (31,2)	0	
Micro-TESE:			
Laterabilidade:			<0,0001^b
<i>Direito</i>	155 (44,4)	0	
<i>Esquerdo</i>	106 (30,4)	0	
<i>Bilateral</i>	88 (25,2)	267 (100,0)	
Tecido extraído (mg):	89,3 (72,1;126,4)	89,6 (72,0;128,0)	0,24 ^a
Estimulação hormonal	182 (52,1)	109 (40,8)	0,0006^b

E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; E2: estradiol IMC: índice de massa corporal; UI: unidades internacionais; LH: hormônio luteinizante; micro-TESE: microdissecção testicular; TT: testosterona total; TL: testosterona livre

^aTeste de Wilcoxon; ^bTeste de Pearson χ^2 .

‡Casos genéticos: obtido sucesso na recuperação espermática em 4 de 14 pacientes com síndrome de Klinefelter (2 não-mosaicos e 2 com mosaicismo) e em 7 pacientes de 21 com microdeleção do cromossomo Y.

‡Biópsia obtida durante micro-TESE

†Incluído hialinização (Total: 3 casos; Falha na recuperação espermática: 1 caso; Sucesso na recuperação espermática: 2 casos)

§Varicocele tratada ou não tratada.

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

4.3. Resultados Secundários

4.3.1. Fatores Associados com Recuperação Espermática Positiva

A **Tabela 3** exibe os resultados da análise de regressão logística que examinou os fatores associados ao sucesso da recuperação espermática. Níveis basais de FSH ($P=0,046$), ausência de varicocele clínica ($P=0,041$), história de varicocelectomia prévia ($P=0,013$), uso da estimulação hormonal antes da micro-TESE ($P=0,0002$) e padrões histopatológicos obtidos das biópsias feitas durante a micro-TESE ($P<0,0001$) foram identificadas como fatores independentes ligados a um resultado positivo na recuperação de espermatozoides. Notavelmente, houve uma relação inversa entre os níveis de FSH e o sucesso na recuperação espermática. Por outro lado, foi observada uma relação positiva entre a ausência de varicocele clínica e história de varicocelectomia com sucesso na recuperação de espermatozoides. O uso de terapia com gonadotrofina também foi associado a um resultado positivo na recuperação espermática. Por fim, a hipoespermatogênese (vs. Sertoli *cell-only*) ou a parada de maturação (vs. Sertoli *cell-only*) na histopatologia testicular foram associadas ao sucesso na recuperação de espermatozoides.

Pacientes submetidos à estimulação hormonal antes da micro-TESE apresentaram chances significativamente maiores de recuperação espermática (OR bruto: 1,76; IC 95% 1,27-2,43, $P=0,012$; OR ajustado: 2,54, IC 95% 1,64-3,93, $P<0,0001$). No grupo tratado, as chances de recuperação espermática foram maiores em indivíduos normogonadotróficos com níveis basais de $FSH<12$ UI/L (OR bruto: 2,25, IC 95% 1,34-3,78, $P=0,012$; OR ajustado: 3,20; IC 95% 1,59-6,44, $P=0,001$) comparados a indivíduos hipergonadotróficos com níveis basais de $FSH\geq 12$ UI/L (OR bruto: 1,72, IC 95% 1,10-2,67, $P=0,011$; OR ajustado: 1,46; 0,74-2,88, $P=0,27$) (**Tabela 4**).

O número de pacientes necessário para tratar (NNT) com estimulação hormonal a fim de obter um caso adicional de sucesso na recuperação espermática, considerando a população total, foi 8,0 (95% IC 4,6-16,6). Analisando os subgrupos normogonadotróficos e hipergonadotróficos, o NNT foi 6 no grupo normogonadotrófico (IC 95% 2,0-8,5), e 12 no grupo hipergonadotrófico (IC 95% 4,1-39,0). A fórmula utilizada para o cálculo do NNT encontra-se no **Anexo 7**.

Tabela 3. Associação entre as características da população total e o sucesso na recuperação espermática.

Termo (unidade)	Estimativa	Erro Padrão	Wald Qui-quadrado	P-valor
<i>Intercept</i>	2,708	1,492	3,284	0,069
Tabagismo [Não-Sim]	0,200	0,331	0,390	0,532
Idade (anos)	-0,019	0,196	0,955	0,324
Duração infertilidade (meses)	-0,001	0,002	0,255	0,613
IMC (kg/m ²)	-0,015	0,023	0,426	0,513
FSH basal (IU/L)	-0,026	0,013	3,984	0,046
LH basal (UI/L)	0,001	0,016	0,009	0,922
E2 basal (pg/mL)	-0,013	0,012	1,280	0,258
TT basal (ng/dL)	0,001	0,002	0,419	0,517
TL basal (ng/dL)	-0,060	0,079	0,569	0,450
Volume testicular (mL; total)	-0,019	0,014	1,871	0,171
Etiologia [gonadotoxina-trauma]	-0,240	0,666	0,129	0,718
Etiologia [criptorquidia-trauma]	-0,373	0,574	0,421	0,516
Etiologia [genética-trauma]	-0,860	0,656	1,722	0,189
Etiologia [idiopático-trauma]	-0,137	0,534	0,501	0,478
Etiologia [orquite-trauma]	0	0	0	1,000
Varicocele clínica [Sim-Não]	-1,760	0,861	4,175	0,041
Varicocelectomia prévia [Sim-Não]	0,821	0,333	6,078	0,013
Estimulação hormonal [Sim-Não]	0,805	0,218	13,557	0,0002
Histopatologia (Hipo-SCO)	8,231	0,177	2146,283	<0,0001
Histopatologia (MA-SCO)	0,626	0,221	9,990	0,001
Resposta: Recuperação espermática=sim; Distribuição: binomial Método de estimação: LASSO com validação AIC; Link do modelo de probabilidade: logit Número de parâmetros: 20; Número de observações: 616 RQuadrado generalizado: 0,388; AIC: 671,76; BIC: 754,52				

AIC: critério de informação de Akaike; BIC: critério de informação Bayesiano; E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; Hialin: hialinização; Hipo: hipoespermatogênese; IMC: índice de massa corporal; LH: hormônio luteinizante; TT: testosterona total TL: testosterona livre; MA: parada de maturação; SCO: Sertoli *cell-only*.

P-valor em negrito correspondem aos preditores com significado estatístico.

Tabela 4. Razão de chances bruta e ajustada para sucesso na recuperação espermática de acordo com a estimulação hormonal com gonadotrofinas.

Grupo	OR bruto (IC 95%)	P-valor ^a	OR ajustado ^b (IC 95%)	P-valor ^c
População geral (n=616)				
Sem estimulação hormonal (n=325)*	1	-	1	-
Com estimulação hormonal (n=291)	1,76 (1,27-2,43)	0,012	2,54 (1,64-3,93)	<0,0001
Normogonadotrófico (n=295)				
Sem estimulação hormonal (n=164)*	1	-	1	-
Com estimulação hormonal (n=131)	2,25 (1,34;3,78)	0,012	3,20 (1,59;6,44)	0,001
Hipergonadotrófico (n=321)				
Sem estimulação hormonal (n=161)*	1	-	1	-
Com estimulação hormonal (n=160)	1,72 (1,10;2,67)	0,011	1,46 (0,74;2,88)	0,27

*Categoria de referência

^aP valor não ajustado

^bOR ajustado (ajustado para idade, duração da infertilidade, tabagismo, índice de massa corporal, nível basal de hormônio folículo-estimulante [FSH], níveis basais de hormônio luteinizante [LH], níveis basais de estradiol, níveis basais de testosterona livre, nível basal de testosterona total, volume testicular total, varicocele clínica, e varicocelectomia prévia).

^cP valor ajustado

Normogonadotróficos: FSH basal <12 UI/L; hipergonadotróficos: FSH basal ≥12 UI/L

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

4.3.2. Características dos Pacientes Tratados com Recuperação Espermática Positiva e Negativa

A **Tabela 5** apresenta as características dos pacientes submetidos à estimulação hormonal com gonadotrofinas antes da micro-TESE. Os pacientes que obtiveram sucesso na recuperação de espermatozoides apresentaram maior volume testicular, níveis basais e pré-micro-TESE de FSH e LH mais baixos, níveis mais altos de E2 e TL, além de maior ocorrência de relatórios de histopatologia testicular indicando sinais de espermatogênese (65,9% vs. 17,4%; $P < 0,0001$) em comparação com aqueles que apresentaram falha na recuperação espermática. Além disso, o grupo com sucesso apresentou um delta T (variação de testosterona entre pré-micro-TESE e basal) significativamente maior do que o grupo negativo, embora ambos os grupos exibissem aumentos significativos nos níveis de testosterona após a estimulação hormonal.

Após a terapia hormonal, o número de pacientes com hipogonadismo bioquímico reduziu para 22,3% (65/291). Neste subconjunto, as taxas de recuperação espermática nos homens eugonádicos (níveis de TT ≥ 350 ng/dL) e hipogonádicos (níveis de TT < 350 ng/dL) foram de 69,4% (157/226) e 38,5% (25/65; $P < 0,001$), respectivamente (OR bruto: 3,64, IC 95%: 2,05-6,46).

Notavelmente, mais pacientes com recuperação espermática positiva usaram uma combinação de rec-hCG e rec-FSH em comparação com aqueles com falha na recuperação de espermatozoides (26,3 % [48/182] vs. 10,1% [11/109]; $P = 0,002$). Além disso, a dose mediana total de rec-FSH foi maior no primeiro grupo. Por outro lado, menos pacientes com sucesso na recuperação espermática usaram um inibidor de aromatase como parte do regime de tratamento (12,6% [23/182] vs. 21,1% [23/109], $P = 0,03$).

No entanto, não houve diferenças significativas entre os dois grupos em relação à idade, índice de massa corporal (IMC), duração da infertilidade, níveis basais de E2 e TL, diagnóstico de varicocele e tecido extraído durante a micro-TESE. Embora ambos os grupos tenham experimentado uma redução substancial nos níveis de FSH e LH ao fim da estimulação hormonal, não houve diferenças significativas entre os correspondentes delta FSH e delta LH. Além disso, a dose mediana de rec-hCG e a duração do tratamento foram comparáveis em ambos os grupos. Por fim, todos os pacientes que não recuperaram espermatozoides tiveram ambos os testículos explorados, enquanto apenas 24,7% daqueles com recuperação espermática positiva foram submetidos a micro-TESE bilateral ($P < 0,0001$).

Tabela 5. Características da população tratada, submetida à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE) e estratificada pelo resultado da recuperação de espermatozoides. Os valores representam medianas (inter-quartis) ou n (%).

	Recuperação espermática positiva (n=182)	Recuperação espermática negativa (n=109)	P-valor
Idade (anos)	36,0 (32,0;39,0)	35,0 (33,0;39,0)	0,99 ^a
IMC (kg/m²)	28,0 (25,1;31,3)	28,3 (25,3;31,1)	0,72 ^a
Duração de infertilidade (meses)	57,6 (38,4;96,0)	60,8 (38,4;115,2)	0,44 ^a
Etiologia:			0,03^b
<i>Idiopático</i>	130 (71,4)	70 (64,2)	
<i>Criptorquidia</i>	27 (14,5)	18 (17,1)	
<i>Genética‡</i>	6 (3,2)	14 (13,3)	
<i>Pós-orquite</i>	7 (3,8)	3 (2,9)	
<i>Pós-gonadotoxina</i>	10 (5,4)	4 (3,8)	
<i>Pós-trauma</i>	2 (1,1)	0 (0,0)	
Volume testicular (mL):			
<i>Direito</i>	10,0 (7,0;15,0)	9,0 (8,0;10,0)	0,01^a
<i>Esquerdo</i>	10,0 (8,0;15,0)	9,5 (7,0;12,0)	0,005^a
<i>Total (Direito + Esquerdo)</i>	20,0 (14,0;28,0)	17,0 (12,0;22,0)	0,003^a
Níveis de FSH (UI/L):			
<i>Basal</i>	11,1 (8,4;19,1)	18 (11,2;26,2)	<0,0001^a
<i>Pré-micro-TESE</i>	4,0 (2,9;7,6)	8,1 (5,4;15,0)	<0,0001^a
<i>Delta FSH*</i>	-5,9 (-10,1;-4,3)	-6,0 (-14,5;-3,1)	0,69 ^a
<i>%Chance pré-pós-tratamento</i>	-61,0 (70,1;-47,2)	-36,9 (63,9;-23,0)	<0,0001^a
Níveis de LH (UI/L):			
<i>Basal</i>	5,6 (4,5;8,4)	6,9 (5,2;12,0)	0,0004^a
<i>Pré-micro-TESE</i>	1,9 (1,3;2,2)	2,1 (1,5;5,7)	0,0005^a
<i>Delta LH*</i>	-3,8 (-5,9;-2,4)	-4,1 (-7,1;-2,3)	0,23 ^a
<i>%Chance pré-pós-tratamento</i>	-67,4 (-78,9;-55,6)	-62,5 (-77,3;-49,6)	0,12 ^a
Níveis de Testosterona total (ng/dL):			
<i>Basal</i>	273,0 (221,0;299,2)	247,0 (180,2;300,9)	0,055 ^a
<i>Pré-micro-TESE</i>	507,5 (424,5;581,2)	376,0 (307,4;465,5)	<0,0001^a
<i>Delta T</i>	249,5 (134,7;339,2)	113,0 (46,5;224,0)	<0,0001^a
<i>%Chance pré-pós-tratamento</i>	99,0 (49,9;139,1)	47,8 (22,3;109,8)	<0,0001^a
Outros hormônios:			
<i>Estradiol basal (pg/mL)</i>	29,0 (22,0;34,0)	26,0 (21,0;32,7)	0,08 ^a
<i>E2 pré-micro-TESE (pg/mL)</i>	43,8 (35,0;54,0)	36,0 (25,0;45,0)	0,0007^a
<i>TL basal (ng/dL)</i>	6,0 (6,0;7,0)	6,0 (4,0;7,0)	0,06 ^a
<i>TL pré-micro-TESE (ng/dL)</i>	11,1 (9,8;13,0)	9,0 (6,0;12,0)	<0,0001^a
<i>Relação basal TT/E2</i>	9,0 (7,5;10,9)	9,2 (6,5;11,7)	0,79 ^a
<i>Relação TT/E2 pré-micro-TESE</i>	11,7 (10,0;14,1)	9,9 (7,3;13,2)	0,0002^a
Varicocele‡:			
<i>Tratada</i>	69 (37,9)	34 (31,2)	0,42 ^b
<i>Não-tratada</i>	36 (19,8)	13 (11,9)	0,13 ^b
<i>Não-tratada</i>	33 (18,1)	21 (19,2)	0,62 ^b
Histopatologia testicular‡:			<0,0001^b
<i>Sertoli cell-only†</i>	62 (34,0)	90 (82,5)	
<i>Parada de maturação</i>	63 (34,6)	19 (17,4)	
<i>Precoce</i>	7 (3,8)	3 (2,7)	
<i>Tardio</i>	56 (30,7)	16 (14,7)	
<i>Hipoespermatogênese</i>	57 (31,3)	0 (0,0)	

(Continuação)

	Recuperação espermática positiva (n=182)	Recuperação espermática negativa (n=109)	P-valor
Micro-TESE:			
Lateralidade:			<0,0001^b
Direito	87 (46,8)	0 (0,0)	
Esquerdo	53 (28,5)	0 (0,0)	
Bilateral	46 (24,7)	105 (100,0)	
Tecido extraído (mg):	89,6 (68,4;139,2)	96,0 (79,2;144,0)	0,09 ^a
Regime de tratamento:			
rec-hCG	134 (73,6)	98 (89,9)	0,002^b
rec-hCG + rec-FSH	48 (26,3)	11 (10,1)	
Adição de Inibidor de Aromatase	23 (12,6)	23 (21,1)	0,03 ^b
Dose total de rec-hCG (UIx10³)	78,0 (78,0;160,0)	78,0 (78,0;160,0)	0,88 ^b
Dose total de rec-FSH (UIx10³)	28,0 (14,0;36,0)	25,0 (12,0;36,0)	<0,001^b
Duração de tratamento (meses)	5,0 (3,0;8,5)	4,5 (3,0;8,0)	0,24 ^b

E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; E2: estradiol; IMC: índice de massa corporal; UI: unidades internacionais; LH: hormônio luteinizante; micro-TESE: extração de espermatozoides testiculares por microdissecção; rec-FSH: hormônio folículo estimulante recombinante; rec-hCG: gonadotrofina coriônica humana recombinante; TT: testosterona total; TL: testosterona livre

^aTeste de Wilcoxon; ^bTeste de Pearson χ^2 .

‡Casos genéticos: todos os 4 pacientes com síndrome de Klinefelter que tiveram recuperação espermática positiva receberam terapia com gonadotrofina, enquanto 5 de 7 pacientes com microdeleção do cromossomo Y que tiveram positividade na recuperação de espermatozoides receberam terapia com gonadotrofina.

‡Biópsias obtidas durante micro-TESE

†Incluído hialinização (Total: 3 casos; Falha na recuperação espermática 1 caso; Sucesso na recuperação espermática: 2 casos)

*(valor pós-tratamento) – (valor pré-tratamento)

‡Níveis de testosterona total pré-micro-TESE entre 500-900 ng/dL

‡Incluídos 3 pacientes com níveis de testosterona total pré-micro-TESE >900 ng/dL

‡Varicocele tratada e não-tratada

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

A **Tabela 6** exibe os resultados da análise de regressão logística avaliando os fatores associados ao sucesso da recuperação de espermatozoides nos pacientes tratados com gonadotrofinas previamente à micro-TESE. Entre os pacientes que receberam estimulação hormonal, apenas os níveis de TT pré-micro-TESE ($P=0,028$) e delta T ($P<0,0001$) foram independentemente associados ao sucesso da recuperação espermática. Notavelmente, houve uma relação positiva entre os níveis de TT pré-micro-TESE e delta T e o sucesso na recuperação de espermatozoides.

As curvas ROC foram construídas para níveis de TT pré-micro-TESE e delta T, respectivamente, para determinar os pontos de corte associados a maiores probabilidades de sucesso na recuperação espermática. Os resultados indicaram que um nível de TT pré-micro-

TESE de 418,5 ng/dL (AUC: 0,78, sensibilidade 0,78, especificidade 0,71) (**Figura 10**) e um aumento absoluto nos níveis de TT entre o início e o fim da estimulação hormonal (Delta T) de 258 ng/dL (AUC: 0,76, sensibilidade 0,50, especificidade 0,92) (**Figura 11**) foram os valores mais acurados para distinguir pacientes com recuperações espermática positivas e negativas.

Tabela 6. Associação das características do paciente e sucesso na recuperação espermática na população tratada.

Termo (unidade)	Estimativa	Erro padrão	Wald Qui-quadrado	P-valor
<i>Intercept</i>	-0,788	0,401	3,851	0,0497
Idade (anos)	0	0	0	1,0000
Duração de infertilidade (meses)	0	0	0	1,0000
Tabagismo [Não]	0	0	0	1,0000
IMC (kg/m ²)	0	0	0	1,0000
Nível de FSH pré-micro-TESE	-0,006	0,015	0,169	0,687
Delta_FSH (UI/L)	0	0	0	1,000
Nível de LH pré-micro-TESE (UI/L)	0	0	0	1,000
Delta_LH (UI/L)	0	0	0	1,000
Nível de E2 pré-micro-TESE (pg/mL)	-0,001	0,007	0,042	0,837
Delta T (ng/dL)	0,005	0,001	18,912	<0,0001
Níveis de TT pré-micro-TESE (ng/dL)	0,005	0,002	4,79	0,0287
Volume testicular (mL; total)	0	0	0	1,000
Etiologia [gonadotoxina-trauma]	0	0	0	1,000
Etiologia [criptorquidia-trauma]	0	0	0	1,000
Etiologia [genético-trauma]	-0,253	0,505	0,251	0,612
Etiologia [idiopático-trauma]	0	0	0	1,000
Etiologia [orquite-trauma]	0	0	0	1,000
Varicocele clínica [Não-Sim]	0	0	0	1,000
Varicocelectomia prévia [Não-Sim]	0	0	0	1,000
Regime de gonadotrofina [hCG-hCG+FSH]	0	0	0	1,000
Dose acumulada de hCG (UI)	0	0	0	1,000
Duração de tratamento [meses]	0	0	0	1,000
Histopatologia (Hipo-SCO)	4,520	0,249	328,172	<0,0001
Histopatologia (MA-SCO)	0,981	0,306	10,252	0,001
Resposta: Recuperação espermática=sim Distribuição: binomial Método de estimativa: LASSO com validação de AIC Link do modelo de probabilidade: logit Número de parâmetros: 8 Número de observações: 291 R-quadrado: 0,430 AIC: 285,25; BIC: 310,57				

AIC: critério de informação de Akaike; BIC: critério de informação Bayesiano; Delta: valor pós-tratamento menos valor pré-tratamento; E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; hCG: gonadotrofina coriônica humana; IMC: índice de massa corporal; LH: hormônio luteinizante; micro-TESE: extração de espermatozoides testiculares por microdissecção; T: testosterona total.

P-valor em negrito correspondem aos preditores com significado estatístico.

Figura 10. Curva ROC dos níveis de testosterona total pré-micro-TESE para a previsão de sucesso na recuperação de espermatozoides.

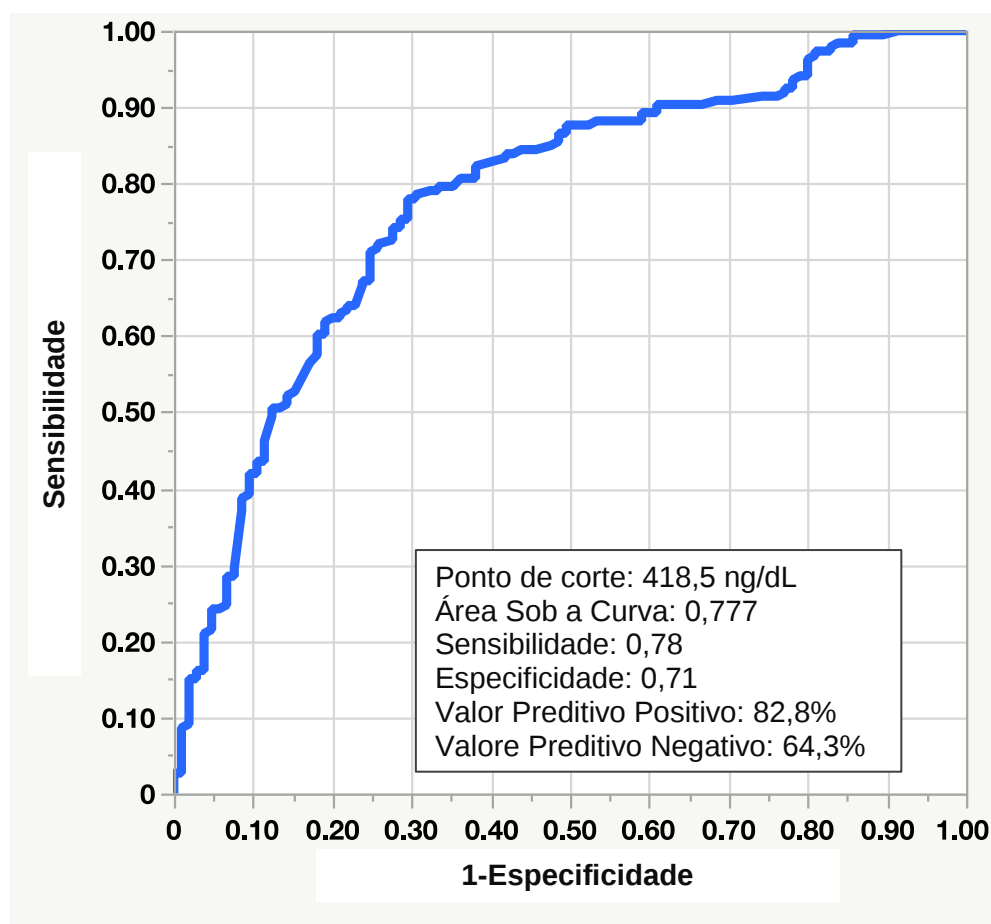
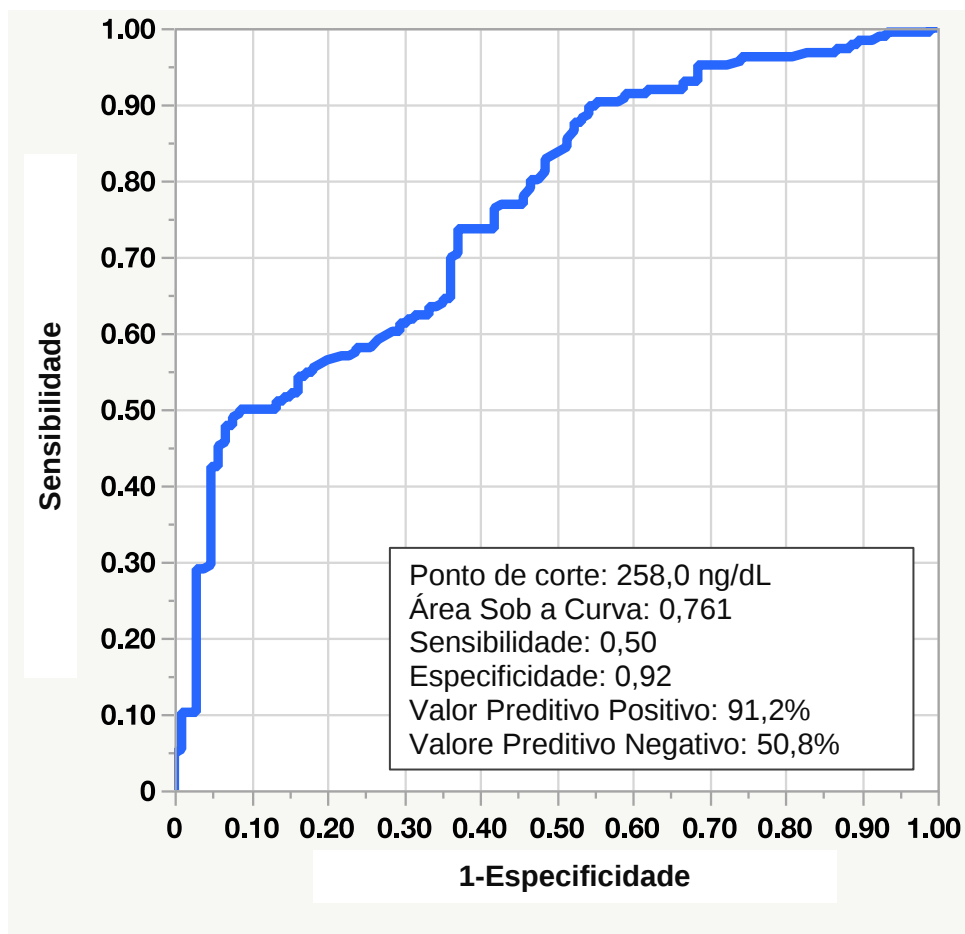


Figura 11. Curva ROC de delta T para a previsão de sucesso na recuperação de espermatozoides.



4.3.3. Resultados da Recuperação Espermática de Acordo com os Resultados da Histopatologia

Todas as amostras histopatológicas foram avaliadas pelo mesmo patologista, sendo que estas apresentaram uma média de 110 cortes transversais de túbulos seminíferos (variando de 70 a 300) conforme recomendado [Rajpert-de Meyts et al., 2017]. A **Tabela 7** apresenta as taxas de sucesso de recuperação de espermatozoides de acordo com os padrões histopatológicos testiculares relatados nas biópsias realizadas durante os procedimentos de micro-TESE. Entre os 616 indivíduos submetidos à micro-TESE, os pacientes com hipoespermatogênese tiveram as maiores taxas de recuperação de espermatozoides (100%), seguidos por aqueles com parada de maturação (62,9%; $P < 0,0007$) e Sertoli *cell-only* (40,0%; $P < 0,0001$). Além disso, os pacientes com parada de maturação (estágios iniciais e tardios) tiveram taxas de recuperação espermática significativamente mais altas do que aqueles com Sertoli *cell-only* ($P < 0,0001$).

Tabela 7. Taxas de recuperação espermática de acordo com padrões histopatológicos na população total. Valores representados pelo n (%)

Padrão histopatológico		OR Bruto [95% IC]	P-valor
Hipoespermatogênese (n=109)	109/109 (100,0)	1,00*	1,0
Parada de maturação (n=162)	102/162 (62,9)	0,0077 [0,0005-0,127]	0,0007
<i>Precoce</i>	8/15 (53,3)	0,0052 [0,0003-0,0985]	0,0005
<i>Tardio</i>	94/147 (63,9)	0,0081 [0,0005-0,1324]	0,0007
Sertoli <i>cell-only</i> † (n=345)	138/345 (40,0)	0,003 [0,0002-0,049]	<0,0001
P-valor ^a	<0,0001		

*População de referência

^aTeste de Pearson χ^2

OR: *odds ratio*

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

Importante destacar que dos 616 pacientes estudados, apenas sete apresentaram quadro clínico duvidoso para diagnóstico de ANO na avaliação inicial. Tais pacientes foram submetidos à biópsia testicular para o diagnóstico diferencial, previamente à micro-TESE, e todos apresentaram padrão histológico de parada de maturação. Dos 7 pacientes, 4 optaram por realizar estimulação hormonal, sendo que 2 receberam apenas rec-hCG e outros 2 receberam tratamento combinado de rec-hCG e rec-FSH por 3 meses. Nenhum destes 7 pacientes receberam inibidor de aromatase. Ao fim, todos os 7 pacientes apresentaram sucesso na recuperação espermática na micro-TESE, sendo que 2 pacientes apresentaram

hipoespermatogênese na biópsia testicular obtida na micro-TESE. Tais indivíduos não haviam recebido estimulação hormonal.

Na **Tabela 8**, são apresentadas as taxas de sucesso da recuperação de espermatozoides com base nos padrões histopatológicos, estratificadas com base na terapia hormonal. Nesta análise, não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de recuperação de espermatozoides entre pacientes com hipoespermatogênese (100,0% vs. 100,0%; $P=1,00$) ou Sertoli *cell-only* (42,1% vs. 37,8%; $P=0,41$), independentemente do uso de terapia com gonadotrofinas. No entanto, pacientes com parada de maturação que receberam terapia com gonadotrofina antes da micro-TESE tiveram chances significativamente maiores de recuperar espermatozoides do que aqueles que não receberam (73,3% vs. 52,5%; OR: 2,62, IC 95%: 1,35-5,09; $P=0,004$). No subconjunto de pacientes com parada de maturação, aqueles com estágios de parada mais avançados que receberam terapia com gonadotrofina alcançaram taxas de recuperação de esperma mais altas do que aqueles que não receberam (OR: 2,62, 95% IC: 1,30-5,28, $P=0,007$). Entretanto, não houve diferença estatística nas taxas de recuperação de espermatozoides dentre os pacientes com estágios iniciais de parada de maturação, independente do uso ou não da estimulação hormonal (OR: 3,50, IC 95%: 0,37-32,97, $P=0,27$).

Tabela 8. Taxas de recuperação de espermatozoides de acordo com padrões histopatológicos e estimulação hormonal com gonadotrofina antes da micro-TESE. Os valores são n (%).

	Com estimulação hormonal (n=291)	Sem estimulação hormonal (n=325)	OR Bruto [95% IC]	P valor
Hipoespermatogênese (n=109)	57/57 (100,0)	52/52 (100,0)	1,00	1,0
Parada de maturação (n=162)	61/82 (73,3)	42/80 (52,5)	2,62 [1,35;5,09]	0,004
<i>Precoce</i> (n=15)	7/10 (70,0)	2/5 (40,0)	3,50 [0,37-32,97]	0,27
<i>Tardio</i> (n=147)	54/72 (75,0)	40/75 (53,3)	2,62 [1,30-5,28]	0,007
Sertoli <i>cell-only</i> † (n=345)	64/152 (42,1)	73/193 (37,8)	1,19 [0,77;1,84]	0,41
P-valor ^a	<0,0001	<0,0001		

^aTeste de Pearson χ^2

OR: *odds ratio*

P-valor em negrito correspondem às comparações com significado estatístico.

4.3.4. Complicações Pós-Operatórias

A **Tabela 9** resume as complicações pós-operatórias precoces (dentro de 30 dias) registradas após micro-TESE. Nesta coorte de 616 pacientes, três desenvolveram hematoma escrotal, sendo dois tratados conservadoramente e um necessitou de reoperação e drenagem. Cinco pacientes tiveram infecções de feridas, todos tratados de forma conservadora, enquanto

quatro desenvolveram infecções profundas do sítio cirúrgico. Destes quatro, dois foram tratados com antibióticos e anti-inflamatórios e não necessitaram de intervenção adicional, enquanto os outros dois necessitaram de reoperação. Um dos casos reoperados resolveu a complicação e não precisou de mais intervenção, mas o outro resultou em orquiectomia unilateral. O paciente submetido à orquiectomia tinha 45 anos, era obeso e apresentava diabetes tipo II.

Dois pacientes desenvolveram complicações sistêmicas durante o procedimento cirúrgico e necessitaram de intubação por insuficiência cardíaca congestiva. Um paciente tinha 53 anos e histórico de diabetes e cardiopatia compensada, enquanto o outro paciente tinha 40 anos e era portador de distrofia miotônica tipo 1 (síndrome de Steinert). Ambos os pacientes foram tratados em unidade de terapia intensiva e se recuperaram sem sequelas aparentes.

Tabela 9. Complicações pós-operatórias precoces (dentro de 30 dias) relatadas nos 616 pacientes submetidos à recuperação de espermatozoides testiculares por microdissecção testicular (micro-TESE).

	N	%
Complicações	14	2,3
Hematoma	3	0,5
Infecção local superficial (ex., infecção de ferida)	5	0,8
Infecção profunda do sítio cirúrgico	4	0,6
Complicações sistêmicas (incluindo pneumonia, embolia pulmonar, tromboembolismo venoso profundo, ventilação prolongada, acidente vascular cerebral, parada cardíaca que requer ressuscitação, infecção do miocárdio, sepse e necessidade de transfusão)	2	0,3
Infecção do trato urinário / outras infecções	0	0,0

No estudo, não foram mensurados resultados pós-operatórios menos graves, como dor e inchaço, nem registrou complicações tardias, como dor crônica, atrofia testicular e hidrocele que poderiam se desenvolver meses após o procedimento. Além disso, dados sobre o acompanhamento pós-operatório de hormônios reprodutivos não foram coletados para este estudo.

4.3.5. Efeitos Adversos da estimulação Hormonal

A **Tabela 10** apresenta os efeitos adversos relatados pelos 291 pacientes que receberam estimulação hormonal. Durante o tratamento, 30 eventos adversos foram documentados, principalmente relacionados a reações no local da injeção. Os pacientes autoavaliaram essas reações, que foram temporárias e não exigiram a interrupção do tratamento.

Dois pacientes apresentaram dores de cabeça persistentes após receber rec-hCG, e o tratamento foi temporariamente interrompido até que uma avaliação neurológica fosse concluída. Foi determinado que o sintoma não estava relacionado à gonadotrofina, e o tratamento foi retomado sem maiores problemas. Três casos de ginecomastia grau I [[Cordova et al., 2008](#)], e quatro casos de mastalgia foram relatados, todos suspeitos de serem devidos a níveis elevados de estradiol circulante e relação TT/E2 anormal (<10); esses pacientes foram submetidos à avaliação complementar e dosagem dos níveis séricos da prolactina e hormônio tireoidiano, que se mostraram dentro da normalidade. Em todos os 7 casos, um inibidor de aromatase foi adicionado ao regime de tratamento, e o efeito adverso desapareceu em seis dos sete casos. Um paciente continuou apresentando ginecomastia apesar do uso de um inibidor de aromatase, mas optou por continuar o tratamento.

Dois pacientes relataram uma diminuição significativa da libido durante o uso do inibidor de aromatase, e seus níveis de estradiol estavam abaixo do limite inferior. Eles foram solicitados a interromper o uso de anastrozol, mas continuaram usando as injeções de gonadotrofina. Os sintomas desapareceram em ambos os casos. Dois pacientes em tratamento associado com anastrozol tiveram que interromper a medicação devido à elevação das enzimas hepáticas; esses pacientes continuaram o tratamento com rec-hCG e não foram excluídos do estudo.

Tabela 10. Efeitos adversos relatados nos pacientes que receberam terapia com gonadotrofina.

	N	%
Efeitos adversos	30	10,3
Reações alérgicas sistêmicas (incluindo erupção cutânea, pulso rápido ou irregular, inchaço da língua e garganta, espirros, respiração ofegante ou dificuldade respiratória grave)	0	0,0
Reações locais (incluindo vermelhidão, coceira, dor, inchaço, hematomas)	15	5,1
Infecção no local da aplicação	0	0,0
Ginecomastia	3	1,0
Mastalgia	4	1,4
Gastrointestinais (incluindo náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia)	0	0,0
Neurológico (incluindo dor de cabeça persistente)	2	0,7
Eventos tromboembólicos	0	0,0
Orquialgia, orquite ou edema escrotal	0	0,0
Disfunção erétil / Diminuição da libido	4	1,4
Elevação de enzima hepáticas	2	0,7

Não houve relatos de mau funcionamento do dispositivo de aplicação do rec-hCG ou rec-FSH. No entanto, cinco casos de erros de medicação foram identificados durante as consultas de acompanhamento, todos relacionados a doses incorretas. Esses pacientes foram reeducados sobre o uso adequado de gonadotrofinas e foram mantidos no estudo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Principais achados

Neste estudo observacional, a hipótese nula de que a taxa de sucesso na recuperação de espermatozoides entre pacientes submetidos à estimulação hormonal não diferia dos pacientes não tratados foi rejeitada. As taxas de sucesso na recuperação espermática pela técnica de micro-TESE foram significativamente maiores no grupo de pacientes submetidos à estimulação hormonal.

Por meio de regressão logística multivariada, foi possível avaliar os fatores independentes associados ao sucesso na recuperação espermática tanto da população geral, quanto do grupo tratado. Na população geral, a estimulação hormonal com gonadotrofina previamente à micro-TESE, padrão histológico com sinais de espermatogênese (parada de maturação e hipoespermatogênese), história de varicocelectomia prévia à micro-TESE, destacaram como fatores preditores positivos para o sucesso da recuperação espermática. Por outro lado, presença de varicocele clínica e níveis basais de FSH mais elevados foram fatores preditores negativos. No grupo tratado, níveis mais elevados de testosterona total prévio à micro-TESE, maior magnitude da variação nos níveis séricos de testosterona pós- versus pré-tratamento (delta de testosterona), e o padrão histológico com sinais de espermatogênese se destacaram como fatores preditores positivos para o sucesso na recuperação espermática.

No grupo de pacientes submetidos à estimulação hormonal, houve diferença entre os subgrupos normogonadotrófico e hipergonadotrófico quanto ao sucesso na recuperação espermática. Utilizando o FSH basal com valor de corte de 12 UI/L para classificar os pacientes como normogonadotróficos (<12 UI/L) ou hipergonadotróficos (≥ 12 UI/L), a razão de chances da recuperação espermática no grupo normogonadotrófico (OR bruto 2,25; IC 95%, 1,134-3,77, $P=0,001$) foi maior quando comparada ao grupo hipergonadotrófico (OR bruto 1,72; IC 95%, 1,10-2,67, $P=0,01$). Entretanto, após ajuste do modelo de regressão levando em consideração o possível impacto das variáveis independentes, a significância estatística na razão de chances da recuperação espermática somente se manteve no grupo normogonadotrófico (OR ajustado 3,20; IC 95%, 1,59-6,44, $P=0,001$).

Pacientes com padrão histológico de hipoespermatogênese apresentaram taxas maiores de recuperação espermática quando comparados aos pacientes com parada de maturação, que por sua vez apresentaram taxas superiores aos pacientes com SCO. Entretanto, apenas os pacientes com parada de maturação demonstraram taxas superiores de recuperação espermática com tratamento hormonal comparado ao grupo não tratado.

No presente estudo, a frequência de efeitos adversos no grupo tratado foi de 10,3%, predominando reações locais leves. Já as taxas de complicações pós-operatórias precoces relacionadas ao procedimento de micro-TESE na população geral foi de 2,3%, predominando quadros leves.

5.2. Interpretação dos achados

Ao contrário de casos de ANO por hipogonadismo hipogonadotrófico em que já se consolidou os benefícios da estimulação hormonal com gonadotrofina exógena na espermatogênese, ainda não há consenso dos benefícios desta terapia e nem mesmo um padrão de regime de tratamento e duração para casos de hipogonadismo normo ou hipergonadotrófico [Esteves, 2015a; Shiraishi, 2014; Tharakan et al., 2022]. Neste estudo, os 291 pacientes com hipogonadismo normo ou hipergonadotrófico que receberam estimulação hormonal com gonadotrofina apresentaram uma razão de chances de sucesso na recuperação espermática 2,5x maior do que o grupo de 325 pacientes não-tratados. O número de pacientes necessário para tratar com estimulação hormonal e obter um caso adicional de sucesso na recuperação espermática pela micro-TESE foi de aproximadamente 8. Do ponto de vista clínico, os achados do presente estudo sugerem que a estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes previamente à micro-TESE é benéfica para pacientes hipogonádicos, pois resulta numa maior taxa de recuperação espermática em comparação aos pacientes não-tratados.

Avaliando os subgrupos normogonadotróficos e hipergonadotróficos separadamente, pode-se observar que o número necessário para tratar com estimulação hormonal e obter um caso adicional de sucesso na recuperação espermática foi menor no subgrupo normogonadotrófico comparado ao subgrupo hipergonadotrófico. Enquanto foram necessários 6 pacientes normogonadotróficos tratados para se obter um caso adicional de sucesso na recuperação espermática, foram necessários cerca de 12 pacientes hipergonadotróficos tratados para o mesmo benefício. A análise ajustada dos dados, entretanto, demonstrou que o benefício do tratamento somente se manteve no grupo normogonadotrófico. É importante ressaltar que os achados mencionados acima foram baseados numa análise de subgrupos, cujo tamanho amostral não tem poder estatístico para inferências precisas. Desta forma, embora do ponto de vista clínico nossos achados sugerem que pacientes normogonadotróficos hipogonádicos seriam aqueles de eleição para se considerar a estimulação hormonal, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar se há diferença na magnitude do efeito entre homens normo e hipergonadotróficos.

Analizando o padrão histopatológico, houve significativamente mais casos positivos entre pacientes com parada de maturação comparado aos pacientes com SCO (62,9% vs. 40,0%, $p < 0,0001$), o que é esperado. Dentre os pacientes que receberam tratamento com gonadotrofina, apenas aqueles com padrão histológico de parada de maturação demonstraram benefício significativo da estimulação hormonal para aumentar as taxas de sucesso na micro-TESE. Destaque se faz para o subconjunto de pacientes com parada de maturação em estágio tardio que apresentaram maiores taxas de recuperação espermática positiva com o tratamento (77,7% vs. 50,6%; $P = 0,0008$) comparado àqueles com estágios precoces de parada de maturação. Entretanto, o tamanho amostral destes subgrupos não oferece poder estatístico para avaliar tais desfechos com precisão. Além disso, as biópsias foram obtidas somente no momento da micro-TESE, muitas das quais provenientes de indivíduos que já haviam se submetido à estimulação hormonal. No presente estudo, os resultados da histopatologia testicular devem ser interpretados com cautela, uma vez que não tiveram a finalidade de prever o desfecho da recuperação espermática da micro-TESE.

Dos pacientes que receberam tratamento hormonal, menos de 25% deles apresentaram hipogonadismo bioquímico no momento da micro-TESE. As taxas de sucesso na recuperação espermática significativamente maiores nos pacientes que se tornaram eugonádicos (69,4% vs. 38,5%, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo que manteve quadro de hipogonadismo bioquímico pós-estimulação hormonal. Níveis séricos de testosterona total pré-micro-TESE $> 418,5$ ng/dl ou Delta T > 258 ng/dL se mostraram relativamente acurados para discriminar pacientes que obtiveram sucesso na micro-TESE daqueles com insucesso.

5.2.1. Espermatogênese e ação das gonadotrofinas

Fisiologicamente, a espermatogênese é regulada do ponto de vista hormonal pela ação sinérgica do LH e FSH [Herati et al., 2020; Caroppo et al., 2021]. Ambos os hormônios são produzidos na hipófise anterior (adenohipófise) e são regulados pela secreção hipotalâmica pulsátil de GnRH. No testículo, as células alvo para a ação do LH são as células de Leydig, presentes no espaço intersticial, enquanto o FSH age nas células de Sertoli, presentes nos túbulos seminíferos [Herati et al., 2020]. A interação desses hormônios com as respectivas células se faz por meio de receptores de membrana específicos [Esteves et al., 2023].

O LH é crucial para a espermatogênese, uma vez que este hormônio estimula as células de Leydig a produzir testosterona, e este por sua vez contribui para a produção e maturação dos espermatozoides [Christin-Maitre et al., 2022]. Após a ligação com receptores androgênicos intratesticulares, a testosterona age nas células de Sertoli por uma via clássica e

uma via não clássica [Caroppo et al., 2021]. Na via clássica (genômica), a testosterona se difunde pela membrana plasmática das células de Sertoli e interage com receptores androgênicos, na qual esse complexo promove a regulação de genes essenciais para a regulação das células germinativas [Shang et al., 2002]. Já na via não clássica (não genômica), o complexo testosterona e receptores androgênicos rapidamente promovem uma cascata de ações enzimáticas por fosforilação e ativação que modulam as expressões gênicas das células germinativas [Toocheck et al., 2016]. Estudos com animais demonstraram que na ausência de testosterona ou receptores androgênicos houve desprendimento prematuro de espermátides redondas das células de Sertoli, assim como parada de maturação ao nível de espermátides redondas [O'Donnell et al., 1996; Kerr et al., 1993; Lei et al., 2001]. A testosterona também contribui com a manutenção da junção intercélulas de Sertoli que são fundamentais para a barreira testículo-sanguínea, que por sua vez é essencial para manter um ambiente adequado para as células germinativas [Willems et al., 2010]. Importante salientar que os níveis de TIT são 50 a 100 vezes maiores quando comparado ao nível sérico circulante [Coviello et al., 2005; Ohlander et al., 2016].

O FSH age sinergicamente com o LH e testosterona, promovendo a ação de fatores de sobrevivência antiapoptóticos e de reguladores complexos de adesão entre as células de Sertoli e as células germinativas a fim de resultar em uma espermatogênese completa [Ruwanpura et al., 2010; Oduwole et al., 2018; Caroppo et al., 2021]. Estudos com ratos modificados geneticamente sem receptores específicos para FSH demonstraram a presença de espermatogênese completa, porém com uma concentração 50% menor de células germinativas e espermátócitos comparado aos animais controle sem alterações genéticas [Oduwole et al., 2018]. Em humanos, apesar de extremamente raro, casos de mutação homozigota dos receptores de FSH estão relacionados a fenótipos masculinos de infertilidade [França et al., 2017]. Ao contrário do FSH, a ausência de receptores de LH promove a azoospermia, sugerindo uma forte relação da testosterona com a espermatogênese [Santi et al., 2020]. Esses modelos experimentais sugerem que a quantidade e qualidade da espermatogênese requerem uma ação intratesticular sinérgica entre testosterona e FSH.

Para isso, é fundamental que tanto a frequência quanto a amplitude da secreção pulsátil de FSH e de LH sejam adequadas [Christin-Maitre et al., 2022]. Entretanto, pacientes com ANO tendem a apresentar níveis séricos basais elevados desses hormônios e, portanto, exibem baixa amplitude de secreção, podendo comprometer a produção de TIT [Sussman et al., 2008; Shiraishi et al., 2012; Shiraishi et al., 2017]. Além disso, estudos sugerem que a constante presença de níveis elevados de FSH promove uma dessensibilização dos receptores deste

hormônio nas células de Sertoli [[Themmen et al., 1991](#); [Foresta et al., 2004](#); [Zhang et al., 2012](#)]. Em particular, estudos utilizando modelos animais demonstraram que a estimulação crônica com FSH induz uma depressão na transdução do sinal de FSH sob as células de Sertoli por meio da redução no número de receptores de FSH (por queda na expressão de RNA mensageiro para formação destes receptores) [[Themmen et al., 1991](#); [Zhang et al., 2012](#)]. Num estudo clínico controlado em humanos, publicado por Foresta et al., foram avaliados 97 homens com oligozoospermia grave divididos em 3 grupos conforme valores de FSH e inibina B (alto FSH e baixa inibina B; alto FSH e inibina B normal; FSH e inibina B normais). Os pacientes com FSH elevado foram prospectivamente randomizados em subgrupos com ou sem adição de acetato de leuprolida (agonista de GnRH) a fim de induzir ao estado hipogonadotrófico. Enquanto os subgrupos com leuprolida receberam rec-FSH (100 UI/dia) e hCG urinário (2000 UI 2x/semana) por 2 meses, os subgrupos sem leuprolida receberam apenas rec-FSH pelo mesmo período. Ao fim, os níveis de inibina B normalizaram com elevação superior a 60% dos valores basais após adição de gonadotrofinas exógenas apenas no subgrupo que foi induzido ao estado hipogonadotrófico com a leuprolida. Tais dados sugerem que a supressão dos altos níveis endógenos de FSH pela ação do hCG, associado a adição de baixas doses de FSH exógeno, podem elevar a produção de inibina B o que indica uma melhora funcional das células de Sertoli e possivelmente com os efeitos positivos na espermatogênese [[Foresta et al., 2004](#)].

A inibina B é produzida exclusivamente pelas células de Sertoli. Além de regular a secreção de FSH por mecanismo de feedback negativo, a inibina B também exerce efeito parácrino intratesticular contribuindo com a espermatogênese [[Barbotin et al., 2015](#)]. Estudos sugerem o uso da inibina B e de FSH como biomarcadores da espermatogênese, uma vez que há uma correlação positiva entre a concentração espermática e inibina B e negativa com os níveis séricos de FSH [[Jankowska et al., 2022](#)]. A análise combinada entre altos níveis de FSH ($>7,8$ UI/L) e baixos de inibina B (<92 npg/mL) demonstrou maior correlação com oligozoospermia do que quando avaliado cada hormônio separadamente [[Barbotin et al., 2015](#)]. Diante do exposto, especula-se que as espermatogônias de pacientes hipergonadotróficos com espermatogênese residual poderiam não receber estímulo adequado para a síntese de DNA e sua proliferação celular frente aos níveis circulantes elevados e constantes de FSH [[Shinjo et al., 2013](#)].

A estimulação hormonal objetivando elevar os níveis de TIT poderia contribuir para otimizar a espermatogênese, uma vez que altas concentrações de TIT são necessárias para a maturação dos estágios finais da espermatogênese e transformação de espermatídes redondas em espermatozoides maduros, processo esse conhecido como espermiogênese [[Matthiesson et](#)

al., 2006; Shiraishi, 2016]. Diante disso, alguns estudos retrospectivos e prospectivos com homens com ANO têm demonstrado o benefício da estimulação hormonal com gonadotrofinas para a elevação dos níveis de TIT, e o aumento nas taxas de sucesso da recuperação espermática, sugerindo progressão de padrões histológicos prévios como parada de maturação para espermatogênese completa [Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Shiraishi, 2016; Laursen et al., 2019]. O uso de hCG exógeno para elevar os níveis de TIT poderia então contribuir para a progressão da espermatogênese em pacientes hipogonádicos.

Na prática clínica, as formas de estimulação hormonal medicamentosa para aumentar a produção endógena de testosterona pelas células de Leydig apresentam mecanismos fisiológicos diferentes. O uso de moduladores seletivos de receptores estrogênicos (do inglês SERM, *selective estrogen receptor modulator*) como o citrato de clomifeno promove um aumento da secreção das gonadotrofinas pela adenohipófise que consequentemente estimula as células de Leydig a produzir mais testosterona [Cannarella et al., 2019]. Porém, pacientes com ANO geralmente já apresentam níveis basais de gonadotrofinas elevados e ainda assim hipogonádicos [Esteves, 2015a]. Em contrapartida ao mecanismo de ação do citrato de clomifeno que necessita de indução central para agir nas células de Leydig, o uso de hCG promove estimulação direta sob as células de Leydig ao se ligar diretamente nos receptores de LH [Roth et al., 2013; Fink et al., 2020].

5.2.1.1 Ação do hCG exógeno na produção de testosterona

O hCG é um hormônio glicoproteico produzido pelo sinciciotrofoblasto fundamental para a manutenção da gestação. Por meio de semelhança molecular ao LH, o hCG tem o potencial de ligação aos receptores de LH presentes nas células de Leydig [Fink et al., 2020; Esteves et al., 2023]. A molécula de hCG é composta por duas subunidades, conhecidas como alfa (com 93 aminoácido, 14,5 kD) e beta (com 145 aminoácidos, 22,2 kD) [Nwabuobi et al., 2017]. Enquanto a subunidade alfa é idêntica entre ambas as moléculas, a subunidade beta do hCG apresenta maior capacidade de glicosilação e consequentemente maior tempo de meia-vida [Esteves, 2015b]. Dessa forma, o potencial de ação da molécula de hCG chega a ser 10 vezes superior à molécula de LH [Fink et al., 2020]. Riccetti et al., estudaram cultura de células de Leydig tratadas com LH recombinante e hCG e demonstraram uma diferença nas respostas dos tratamentos de forma quantitativa e não qualitativa. Apesar do uso de hCG recrutar 10 vezes mais AMP cíclico comparado ao LH, e sendo o AMP cíclico um mediador da esteroidogênese, não houve diferença quanto aos níveis de testosterona entre os diferentes tratamentos [Riccetti et al., 2017].

Os recursos para poder avaliar o atual ambiente hormonal intratesticular são invasivos com necessidade aspiração do parênquima testicular com agulhas finas ou obtendo amostras de biópsia do testículo para análise laboratorial [Roth et al., 2010b; Lima et al., 2020]. Roth et al. induziram 37 homens férteis ao quadro de deficiência de gonadotrofinas após administração de antagonista de GnRH e randomicamente forneceram placebo, ou 15, 60 ou 125 UI de hCG urinário em dias alternados ou 7,5 g diários de testosterona em gel por 10 dias. Os níveis de TIT foram avaliados por meio de tecido testicular aspirado com agulha fina no início e ao fim do protocolo, sendo que houve uma correlação significativa entre a posologia do hCG e níveis de TIT, assim como sérico ($P < 0,01$) [Roth et al., 2010b]. Um estudo prospectivo publicado por Coviello et al. corrobora com a hipótese de uma relação dose-dependente entre hCG e níveis de TIT [Coviello et al., 2005]. Neste estudo, os autores administraram semanalmente 200 mg de enantato de testosterona em 29 homens férteis e randomicamente combinaram com placebo, ou com 125, 250 ou 500 UI de hCG urinário em dias alternados por 3 semanas. Os níveis de TIT foram obtidos por meio de aspiração testicular com agulha fina no início e ao fim do protocolo. Os autores concluíram que os níveis de TIT elevaram linearmente conforme aumento de dose de hCG ($P < 0,001$) [Coviello et al., 2005].

A principal etapa dependente de testosterona na espermatogênese se chama espermiogênese, correspondente a fase final e pós meiótica com o alongamento das espermatídes redondas [Shiraishi et al., 2017]. Singh et al. demonstraram, em um estudo com ratos, uma forte e dependente relação dos níveis de TIT com a espermiogênese [Singh et al., 1995]. Por outro lado, os níveis ideais de TIT para a produção efetiva de espermatozoides é incerto, uma vez que as expressões dos receptores androgênicos nas células de Sertoli variam entre indivíduos, assim como outros fatores [Kato et al., 2014]. Apesar de ainda não haver dados precisos envolvendo as mudanças dinâmicas hormonais com a espermatogênese, estudos sugerem que o uso de hCG, ao estimular a elevação dos níveis de TIT, favoreça a completa espermatogênese em pacientes com padrão histológico de parada de maturação [Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Shiraishi et al., 2016; Laursen et al., 2022]. A literatura tem demonstrado que os níveis de TIT são muito maiores do que as concentrações séricas, porém ainda há dúvidas quanto a sua correlação precisa e se há diferença entre pacientes saudáveis e inférteis [Coviello et al., 2005].

Para melhor compreender a correlação entre níveis de TIT e séricos, Roth et al. avaliaram 10 homens saudáveis e compararam os níveis séricos de testosterona com os níveis de TIT de amostras do parênquima testicular obtidas por aspiração com agulha fina. Os autores encontraram uma correlação significativa entre as concentrações de testosterona sérica e

intratesticular ($r=0,67$, $P=0,03$) [Roth et al., 2010a]. Coviello et al. demonstraram que os níveis de TIT de 29 homens saudáveis, obtidos por aspiração de tecido testicular com agulha fina, foram 80 vezes maiores comparado a concentração sérica de testosterona (1174 ± 79 nmol/L vs. $14,1 \pm 1,1$ nmol/L) [Coviello et al., 2005]. Por outro lado, Heracek et al. avaliaram 84 homens com ANO e compararam os níveis de TIT por imunohistoquímica, obtidos de amostras de tecido testicular durante micro-TESE, com níveis séricos de testosterona e encontraram uma fraca correlação ($r=0,26$, $P=0,019$) [Heracek et al., 2018]. Já Shiraishi et al. avaliaram os níveis de TIT de 18 homens com AO e outros 72 homens com ANO por meio de espectrometria de massa de fluidos testiculares, coletados no intraoperatório de micro-TESE, e compararam com os níveis séricos de testosterona. Tanto em homens com AO quanto naqueles com ANO, os autores não encontraram correlação entre os níveis de testosterona intratesticulares com os séricos ($r=0,258$, $P>0,05$; $r=0,086$, $P>0,05$; respectivamente) [Shiraishi et al., 2021].

Vale destacar que alguns pacientes que recebem gonadotrofina exógena não respondem com aumento significativo dos níveis séricos de testosterona [Reifsnnyder et al., 2012; Bauman et al., 2017; Madhusoodanan et al., 2019]. Bauman et al. avaliaram homens com e sem lesão medular crônica quanto à resposta ao uso de hCG para elevar níveis séricos de testosterona. Enquanto 19,6% dos homens com lesão medular crônica e hipogonadismo não elevaram os níveis séricos de testosterona acima de 12,1 nmol/L (350 ng/dL), 28,4% do grupo sem lesão medular e hipogonadismo não responderam ao estímulo hormonal com hCG [Bauman et al., 2017]. No presente estudo, apenas 22,3% (65/291) dos pacientes tratados com rec-hCG mantiveram níveis de testosterona total circulante inferior a 350 ng/dl no momento da micro-TESE. Portanto, a reversão do hipogonadismo bioquímico por meio da estimulação hormonal, no presente estudo, foi de 77,7%. Corroborando a esta expectativa, o grupo que recebeu hCG previamente a cirurgia no presente estudo apresentou taxas de sucesso na recuperação espermática superiores ao grupo não tratado.

No entanto, em um relato de caso publicado por Caroppo et al., um paciente com ANO, testosterona sérica de 128 ng/dL, e níveis normais de 17-hidroxiprogesterona (88 ng/dL) recebeu inicialmente hCG urinário na dose de 2.000 UI 2x/semana. Mesmo após elevar a dosagem de hCG para até 5.000 UI a cada 5 dias, os níveis séricos de testosterona mantiveram baixos, embora os níveis de 17-hidroxiprogesterona se encontraram estáveis e normais. Os autores realizaram então a micro-TESE diante dos níveis normais de 17-hidroxiprogesterona e obtiveram sucesso na recuperação de espermatozoides, que possibilitou tanto a criopreservação dos mesmos, quanto a fertilização de 5 óvulos pelo método de ICSI, gerando 2 blastocistos de boa qualidade [Caroppo et al., 2023]. Apesar de cada vez mais estudos estarem demonstrando

uma possível forma de avaliar níveis de TIT com o uso da 17-hidroxiprogesterona, esses dados não foram coletados no presente estudo.

5.2.1.2. Ação do hCG exógeno sobre níveis de FSH

O uso de hCG exógeno poderia, também, estimular a espermatogênese ao provocar queda dos níveis circulantes de FSH, restaurando as concentrações fisiológicas de FSH e testosterona, assim como o aumento da sensibilidade dos receptores de FSH nas células de Sertoli [Foresta et al., 2004; Foresta et al., 2009; Shinjo et al., 2013; Hu et al., 2018]. A ligação do hCG aos receptores de LH nas células de Leydig estimula a produção intratesticular de testosterona, que por sua vez atinge a corrente sanguínea e modula, pelo mecanismo de retroalimentação negativa, a secreção hipofisária de FSH [Shiraishi et al., 2012; Laursen et al., 2019, Esteves et al., 2023]. Essa modulação hormonal poderia acarretar um “reset” dos receptores de FSH nas células de Sertoli [Foresta et al., 2004; Shiraishi et al., 2016].

Nos pacientes com redução significativa dos níveis séricos de FSH, submetidos ao tratamento com hCG, sugere-se que a coadministração de rec-FSH poderia ser benéfica para a atividade das células de Sertoli pela sua ação nos receptores de FSH após o processo de “reset” mencionado acima [Foresta et al., 2004; Laursen et al., 2022]. Em um estudo controlado publicado por Shiraishi et al., 48 pacientes com falha na micro-TESE foram divididos em dois grupos: 20 pacientes sem tratamento e outros 28 submetidos a modulação hormonal com hCG urinário associado ou não a rec-FSH. Apenas o grupo tratado apresentou sucesso na recuperação espermática na segunda micro-TESE (21,4%), sendo que o subgrupo que recebeu apenas hCG não apresentou diferença nas taxas de sucesso de micro-TESE comparado ao subgrupo que recebeu hCG combinado a rec-FSH (15,4% vs. 26,7%, $P>0,05$) [Shiraishi et al., 2012].

No presente estudo, cerca de 80% dos pacientes reverteram a condição de hipogonadismo bioquímico com rec-hCG. De forma geral, houve redução concomitante dos níveis séricos de FSH no grupo tratado. A redução de tais níveis foi tão marcante num subgrupo de 59 indivíduos (20,3%), que necessitaram receber terapia hormonal suplementar com rec-FSH associado ao rec-hCG. Porém, não se observou associação entre a variação dos níveis de FSH e de LH pós-tratamento e pré-tratamento (delta FSH e delta LH, respectivamente) com as taxas de sucesso na recuperação de espermatozoides pela micro-TESE. No entanto, o grupo de pacientes com sucesso na recuperação espermática apresentou mais indivíduos com tratamento combinado de rec-hCG com rec-FSH comparado ao grupo de pacientes que falharam (26,3% vs. 10,1%; $P=0,002$).

5.2.2. Varicocelectomia e ANO

Assim como a estimulação hormonal com gonadotrofina previamente a cirurgia para recuperação espermática, a correção cirúrgica de varicocele clínica previamente ao procedimento de recuperação espermática é controversa para pacientes com ANO [Esteves, 2015a]. São poucos os estudos e com pequeno número de pacientes com ANO para elucidar a influência da varicocelectomia na recuperação de espermatozoides no ejaculado após a cirurgia, assim como o aumento das chances de sucesso na recuperação cirúrgica de espermatozoides testiculares [Kaltsas et al., 2022]. Além disso, aguardar os possíveis benefícios da cirurgia de varicocelectomia adia a programação de micro-TESE por pelo menos 3 meses, devendo todo casal ser orientado quanto as limitadas evidências que recomendam essa conduta [Schlegel et al., 2021].

Enquanto ainda há dúvidas quanto a presença coincidente da varicocele em pacientes com ANO ou se há responsabilidade por sua parte aos danos da espermatogênese, a correção cirúrgica tem por objetivo otimizar a produção espermática [Weedin et al., 2010; Miyaoka et al., 2012]. O mecanismo pelo qual a varicocele afeta fertilidade ainda é incerto. Acredita-se que um complexo multifatorial em conjunto seja responsável pelos efeitos negativos sobre a espermatogênese [Jesen et al., 2017; Cannarella et al., 2023]. A presença de válvulas insuficientes ou ausentes em veias do plexo pampiniforme favorece ao refluxo de sangue patológico [Naughton et al., 2001]. O aumento da pressão hidrostática resulta na elevação de estresse oxidativo que por sua vez prejudica as células germinativas direta ou indiretamente, induzindo apoptose [Agarwal et al., 2012; Zylbersztejn et al., 2013; Romeo et al., 2014]. Outros potenciais mecanismos induzidos pela varicocele incluem a hipertermia escrotal, hipóxia, refluxo de metabólitos renais e adrenais, desequilíbrio hormonal e formação de anticorpos antiespermatozoides [Agarwal et al., 2012; Jesen et al., 2017; Zylbersztejn & Esteves, 2020].

Diversos trabalhos já demonstraram a possibilidade do paciente com ANO apresentar espermatozoides no ejaculado após varicocelectomia, evitando assim a necessidade de intervenção para recuperação cirúrgica de espermatozoides, assim como o aumento nas taxas de sucesso para captação espermática, quando ainda mantido azoospermia [Esteves et al., 2016; Kaltsas et al., 2022]. Em uma revisão sistemática e metanálise publicada por Esteves et al., 43,9% (151/344) dos pacientes (variando de 20,8% a 55,0%) apresentaram espermatozoides no ejaculado após 4 a 11 meses de submetidos a varicocelectomia [Esteves et al., 2016]. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que pacientes com ANO com varicocele clínica tratada apresentaram maiores taxas de sucesso na recuperação espermática do que os não tratados (OR:

2,65; IC 95%: 1,69-4,14; $P < 0,0001$; $I^2 = 0$) após uma média de 10,9 meses de operados (variando de 3 a 23,6 meses).

No presente estudo, por meio de análise de regressão logística multivariada, foi observado uma associação positiva entre o histórico de varicocelectomia prévio a micro-TESE ($P = 0,013$) e a ausência de varicocele clínica ($P = 0,04$) com o sucesso na recuperação de espermatozoides (**Tabela III**). Nossos achados sugerem que a correção cirúrgica da varicocele previamente à micro-TESE deva ser considerada nos pacientes com ANO afetados pela doença, corroborando estudos anteriores. Entretanto, estudos prospectivos, particularmente de natureza randomizada, são necessários para confirmar o benefício da varicocelectomia neste contexto.

5.3. Relevância clínica dos achados

A incerteza do sucesso na captação espermática pode conferir prejuízos financeiros e psicológicos ao casal. A possibilidade de analisar dados não invasivos para prever o sucesso no procedimento cirúrgico para recuperação espermática é essencial. Com exceção dos padrões histopatológicos, dados como níveis de testosterona, FSH e volume testicular são controversos como preditores de positividade na micro-TESE [Eken et al., 2018; Mehmood et al., 2019; Arshad et al., 2020]. Em um trabalho recente de revisão com mais de 60 artigos analisados, os autores demonstraram como preditores positivos: varicocelectomia prévia à captação cirúrgica de espermatozoides, micro-TESE como técnica cirúrgica de escolha, estimulação hormonal para fins de elevar testosterona intratesticular, e histologia testicular com sinais de espermatogênese (parada de maturação e hipoespermatogênese) [Arshad et al., 2020].

No presente estudo, realizamos análises de regressão logística multivariada para avaliar fatores associados ao sucesso na recuperação de espermatozoides entre a população geral e entre o grupo tratado. Dentre os 616 pacientes estudados, o uso de gonadotrofina antes da micro-TESE ($P = 0,0002$), a presença de um dos padrões histológicos com sinais de espermatogênese (parada de maturação e hipoespermatogênese, com $p = 0,001$ e $p = 0,0006$, respectivamente), história de varicocelectomia ($P = 0,013$), o nível de FSH basal ($P = 0,046$) e a ausência de varicocele clínica ($P = 0,041$) estiveram associados como fatores independentes ligados ao sucesso na recuperação espermática.

Dentre o grupo tratado, a regressão logística englobou fatores clínicos e bioquímicos pré e pós estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes. Com relação aos dados laboratoriais, apenas os níveis de testosterona total pré-micro-TESE ($P = 0,028$) e a variação dos níveis de testosterona basal antes e após a modulação hormonal até a cirurgia

(delta T) ($P < 0,001$) foram associados como fatores independentes à positividade da micro-TESE.

Por meio de análise das curvas ROC, os níveis de testosterona total pré-micro-TESE (AUC 0,78) e delta T (AUC 0,76) demonstraram ser bons preditores quanto ao sucesso na recuperação espermática por meio da micro-TESE (Fig. 11 e 12). O valor de corte de Youden para testosterona pré-micro-TESE e delta T foram de 418,5 ng/dL (IC 95%, sensibilidade 0,78, especificidade 0,71) e 258 ng/dL (IC 95%, sensibilidade 0,50, especificidade 0,92), respectivamente. Valores de áreas abaixo da curva entre 0,70 e 0,80 denotam moderado poder de discriminação [de Hond et al., 2022]. Dessa forma, nossos achados sugerem que homens com ANO e hipogonadismo bioquímico submetidos a estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes pré-microTESE apresentarão maior chance de sucesso na recuperação espermática quando atingido valores de testosterona total sérica pré-operatória igual ou superior a 418,5 ng/dL e variação mínima de 258 ng/dL, entre os níveis pré-operatórios versus basais.

Nossos resultados também sugerem que o efeito benéfico da estimulação hormonal seja limitado aos indivíduos com padrões histológicos favoráveis. No presente estudo, dentre os padrões histológicos observados, a presença de parada de maturação, principalmente quando em fase tardia, associou-se ao aumento nas taxas de recuperação espermática pós-modulação hormonal com gonadotrofina recombinante previamente a micro-TESE ($P < 0,0001$). Dessa forma, o conhecimento da histologia testicular do paciente poderia ser uma forma de auxiliar o médico no processo de seleção dos pacientes com melhores chances de resposta à estimulação hormonal quanto à recuperação espermática, embora tal conduta não seja recomendada rotineiramente.

No entanto, é importante salientar que as amostras histopatológicas foram obtidas apenas durante o procedimento de micro-TESE e foram usadas com o objetivo primário de confirmar o diagnóstico de ANO. A avaliação dos resultados apresentados, no que se refere à associação entre padrões histológicos e sucesso na recuperação espermática, devem ser interpretados com cautela, pois muitos pacientes já haviam sido submetidos à estimulação hormonal previamente ao procedimento cirúrgico. Desta forma, as biópsias testiculares obtidas de pacientes tratados introduziram um viés, uma vez que refletiram o padrão histológico predominante após a exposição do parênquima testicular à estimulação hormonal. Estudos tem demonstrado um possível avanço na espermatogênese por meio da estimulação hormonal [Shiraishi et al., 2016; Hu et al., 2016].

Apesar destas considerações, uma questão relevante seria a discussão do papel da biópsia testicular diagnóstica de rotina para os pacientes com ANO candidatos à estimulação hormonal previamente a micro-TESE. Nos pacientes com ANO, a espermatogênese não necessariamente se distribui de forma homogênea por todo parênquima testicular. Há a possibilidade de se encontrar túbulos seminíferos exibindo estágios variados desde SCO a hipoespermatogênese [Abdullah & Bondagji, 2011; Siadati et al., 2017; Punjani et al., 2021b]. Portanto, a presença de uma amostra de biópsia testicular apresentando histologia desfavorável quanto ao sucesso da recuperação espermática (ex. SCO) não necessariamente indica a impossibilidade de haver áreas focais com espermatogênese completa em outras partes do testículo [Miyaoka et al., 2019; Arshad et al., 2020; Kaltsas et al., 2023]. Um paciente pode ser submetido a uma biópsia com resultado de SCO e não receber a proposta de otimização hormonal, mesmo havendo outras áreas de espermatogênese em estágio mais avançado como parada de maturação, comprometendo assim uma conduta clínica. Ademais, a extração de tecido testicular com propósito de análise histopatológico pode desperdiçar áreas focais com espermatogênese e comprometer o sucesso na micro-TESE futura [Esteves et al., 2011b; Esteves, 2015a]. O envio de amostras de parênquima testicular para análise histológica em laboratório de patologia poderia ainda, acabar por identificar focos de espermatogênese ativa, sendo esses desperdiçados uma vez que não há possibilidade de criopreservar tecido testicular para uso clínico após o processamento histológico. Dessa forma, especialistas e diretrizes internacionais não recomendam realizar biópsia testicular para fins de prever chances de sucesso na recuperação espermática [Esteves, 2015a; Salonia et al., 2021].

Na Androfert, realizamos a biópsia do parênquima testicular de rotina no intraoperatório do procedimento de micro-TESE, mas também em casos excepcionais para diferenciação entre AO e ANO [Andrade et al., 2021]. Como o laudo histopatológico é o método padrão-ouro para confirmar o diagnóstico de ANO, realizamos a biópsia testicular no presente estudo em todos os pacientes durante a micro-TESE para confirmação diagnóstica [Esteves, 2015a; Andrade et al., 2021]. Diante do exposto, o urologista deve discutir com o casal fatores favoráveis e desfavoráveis quanto ao benefício de realizar biópsia testicular previamente a micro-TESE. O propósito da biópsia diagnóstica pré-recuperação espermática seria de orientação quanto a prognóstico de sucesso do procedimento e de oferecer a possibilidade de aumentar as chances de sucesso ao indicar estimulação hormonal para casos de parada de maturação confirmados. Uma vez optado por realizar a biópsia, este procedimento deve ser efetuado num serviço especializado em reprodução assistida que possibilite fazer a

análise concomitante a fresco do material extraído. Caso os espermatozoides sejam encontrados, estes já podem ser criopreservados [Esteves, 2015a].

5.4. Comparação com outros estudos da literatura

Desde a apresentação da técnica de micro-TESE por Schlegel em 1999, as taxas de sucesso se mantêm relativamente estáticas, variando entre 40-60% [Schlegel, 1999; Shiraishi et al., 2012; Corona et al., 2019]. Diante desse cenário, diversos trabalhos têm avaliado formas variadas de estimulação hormonal para elevação de TIT em pacientes com ANO e hipogonadismo hiper ou normogonadotróficos por meio de uso isolado ou combinado de medicamentos como citrato de clomifeno e gonadotrofinas (urinárias ou recombinantes) associados ou não a inibidores de aromatase com o propósito de maximizar as taxas de sucesso na recuperação espermática [Reifsnyder et al., 2012; Hussein et al., 2013; Peng et al., 2022]. Por outro lado, são poucos os estudos controlados que utilizaram gonadotrofinas recombinantes como terapia de estimulação hormonal prévia a cirurgia para recuperação espermática [Laursen et al., 2022; Peng et al., 2022].

Estudos prévios já demonstraram uma relação positiva entre níveis séricos normais de testosterona e taxas de sucesso na recuperação espermática [Mehmood et al., 2019; Arshad et al., 2020]. Em um estudo de revisão, Caroppo et al. avaliaram seis trabalhos que comparavam as taxas de sucesso na recuperação espermática entre homens com níveis séricos de testosterona normais e hipogonádicos. Com um total de 2046 pacientes incluídos nos 6 estudos analisados, todos retrospectivos, os autores demonstraram maiores taxas de sucesso na recuperação espermática em pacientes com níveis séricos de testosterona dentro da normalidade quando comparado aos homens hipogonádicos (OR 1,63, IC 95% 1,08-2,45, P=0,02) [Caroppo et al., 2021].

Enquanto já se consolidou na literatura os benefícios da administração de gonadotrofinas exógenas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico [Fραιetta et al., 2013], há controvérsias quanto a eficácia do tratamento hormonal empírico em pacientes com falência espermatogênica, principalmente na presença de altos níveis séricos de gonadotrofinas [Esteves, 2015a; Minhas et al., 2021]. Entretanto, a estimulação paradoxalmente fraca nas células de Leydig e de Sertoli pelas gonadotrofinas endógenas em pacientes com ANO, como já discutido, sugere um potencial benefício do tratamento endócrino.

A otimização dos níveis de testosterona em pacientes com ANO tem sido explorada por diversos autores. Em 2002, Madgar et al. avaliaram 20 pacientes azoospermicos com síndrome de Klinefelter não mosaicos, sendo todos submetidos a estimulação hormonal com

hCG urinário. Os autores demonstraram que o grupo com sucesso na recuperação espermática apresentou níveis séricos de testosterona significativamente superiores ao grupo que falhou ($P < 0,005$) [Madgar et al., 2002]. Ramasamy et al. publicaram um estudo retrospectivo com 68 homens com síndrome de Klinefelter não mosaicos em que a terapia de estimulação hormonal pré cirúrgica não resultou em maior sucesso na recuperação espermática (43 de 68 pacientes ou 62,2% vs. 19 de 22 pacientes ou 82,6%, $P = 0,06$). No entanto, os autores utilizaram variados medicamentos no tratamento hormonal, dentre eles, inibidores de aromatase, citrato de clomifeno e hCG. Porém, neste estudo, o grupo de pacientes que respondeu a estimulação hormonal, atingindo níveis séricos de testosterona pré-operatórios superiores a 250 ng/dL, apresentou taxa de sucesso na recuperação espermática significativamente maior comparado ao grupo que recebeu estimulação e não respondeu (77% vs. 55%, $P = 0,05$) [Ramasamy et al., 2009].

Guo et al. avaliaram 184 homens com síndrome de Klinefelter não mosaicos no qual o grupo tratado com hCG urinário (134 pacientes) não apresentou resultados superiores na recuperação espermática comparado ao grupo que não recebeu modulação hormonal (44,0% vs. 43,3%). Porém, por meio de regressão logística multivariada, os autores demonstraram maiores taxas de sucesso na micro-TESE em pacientes que apresentavam níveis de testosterona sérica pré-cirúrgica superiores a 13,1 nmol/L (OR 1,09; IC 95%, 1,04-1,16, $P = 0,002$; AUC=62,4%) [Guo et al., 2020], corroborando nossos achados.

Num estudo avaliando 48 pacientes com ANO e histórico de falha na primeira micro-TESE, Shiraishi et al. demonstraram benefício da modulação hormonal previamente a segunda micro-TESE. Aproximadamente 1/5 dos pacientes do grupo que recebeu modulação hormonal com hCG urinário associado ou não a rec-FSH (6 de 28 pacientes) apresentou sucesso na segunda micro-TESE, enquanto todos os pacientes do grupo controle, sem tratamento, falharam (21,4% vs. 0%, $P < 0,05$) [Shiraishi et al., 2012]. Neste mesmo estudo, a taxa de sucesso na recuperação espermática do subgrupo que recebeu apenas hCG não diferiu do subgrupo que recebeu hCG combinado a rec-FSH. Porém, ambos os subgrupos apresentaram elevação significativa dos níveis séricos de testosterona. Apesar dos elevados níveis de gonadotrofinas nos pacientes com ANO, a baixa amplitude na secreção de LH não ativa adequadamente as células de Leydig a produzirem testosterona [Keenan et al., 2004].

Utilizando-se de variadas formas de estimulação farmacológica para elevar níveis séricos de testosterona além do uso de hCG isolado (9/348; 2,6%), como anastrozol (inibidor de aromatase não hormonal) isolado (180/348; 51,7%) ou combinado com hCG (29/348; 8,3%), citrato de clomifeno (66/348; 18,9%), testolactone (inibidor de aromatase hormonal) isolado

(14/348; 4%) ou combinado com hCG (12/348; 3,4%) e outras (38/348; 10,9%), Reifsnnyder et al. não demonstraram resultados significativamente superiores nos grupos tratados comparados ao grupo controle (157/307; 51% vs. 25/41; 61%, $P=0,31$) [Reifsnnyder et al., 2012]. Os autores também não encontraram diferença quanto as taxas de sucesso na recuperação espermática mesmo no grupo tratado apresentando níveis de testosterona acima de 250 ng/dL comparado ao grupo de pacientes tratados que não responderam e atingiram níveis de testosterona sérica inferior a 250 ng/dL (51% vs. 51%, $P=0,97$). Vale salientar que a população que utilizou hCG isolado neste estudo foi mínima, além de que os autores não especificaram qual tipo de formulação de hCG foi utilizada.

Por outro lado, Hussein et al., avaliando pacientes com ANO que receberam variadas formas de otimização de testosterona endógena prévio a micro-TESE, demonstraram maior taxa de recuperação espermática no grupo tratado comparado ao controle (252/442; 57,0% vs. 39/116; 33,6%, $P<0,001$) [Hussein et al., 2013]. Os 496 pacientes que receberam tratamento hormonal iniciaram estimulação com citrato de clomifeno, sendo subdivididos em esquemas de tratamento com adição ou não de gonadotrofinas (hCG e hMG). Nenhum paciente tratado recebeu apenas hCG em isolado. Ademais, os pacientes deste estudo não foram avaliados quanto a hipogonadismo bioquímico basal, nem mesmo quanto ao padrão histológico.

Estudos prévios sugerem que a terapia com hCG urinário (combinado ou não com FSH recombinante) ou apenas FSH recombinante contribuíram na progressão da espermatogênese em pacientes com parada de maturação [Shiraishi et al., 2012; Kobori et al., 2015]. Estudos com animais demonstraram a ação de rec-FSH sobre a multiplicação de células germinativas pré-meióticas (espermatogônias e espermatócitos), assim como de células de Sertoli e espermatídes redondas [Singh et al., 1996]. Shiraishi et al. obtiveram sucesso na recuperação espermática de homens com ANO por quimioterapia após estimulação hormonal com hCG urinário combinado ou não com FSH recombinante. Neste estudo, os dois únicos pacientes azoospermicos com sucesso na recuperação espermática, dentre os seis avaliados, apresentavam parada de maturação como padrão histológico na primeira micro-TESE que falhou e sem modulação hormonal [Shiraishi et al., 2014]. Outros trabalhos também avaliaram pacientes com ANO que falharam em uma primeira micro-TESE e puderam avaliar a evolução do padrão histológico entre a primeira e a segunda abordagem de micro-TESE após modulação hormonal com hCG urinário combinado com FSH recombinante ou hMG [Shiraishi et al., 2016; Hu et al., 2018]. O uso de FSH recombinante em pacientes com parada de maturação, que falharam em uma tentativa prévia de recuperação espermática, pode contribuir com a presença de espermatozoides no ejaculado [Kobori et al., 2015].

No presente estudo, os pacientes com parada de maturação, principalmente aqueles com estágio tardio, demonstraram benefício da modulação hormonal prévio a micro-TESE com maior taxa de recuperação espermática. Já os pacientes com hipoespermatogênese e SCO não demonstraram significativamente mais resultados positivos na micro-TESE com o uso de gonadotrofinas. Diferentemente a esse achado, um estudo de coorte publicado por Laursen et al. demonstrou que pacientes com hipoespermatogênese também podem se beneficiar da modulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes. Neste estudo, os autores avaliaram 8 pacientes com ANO e histórico de recuperação espermática sem sucesso por meio da técnica de TESA, submetendo estes à estimulação hormonal com rec-hCG combinado ou não com rec-FSH prévio a segunda TESA. Dois dos oito pacientes apresentaram espermatozoides no ejaculado, enquanto outros dois pacientes obtiveram espermatozoides recuperados na segunda TESA. Desses quatro pacientes com sucesso na recuperação espermática pós modulação hormonal, 3 apresentavam hipoespermatogênese e um com parada de maturação em estágio tardio como padrão histológico presente na primeira TESA que falhou [Laursen et al., 2022].

Todos os pacientes no presente estudo tiveram diagnóstico de ANO confirmada por histologia testicular obtidos durante a cirurgia de micro-TESE. Tal prática não foi observada na maioria dos estudos citados acima, onde os pacientes tiveram o diagnóstico de ANO sem confirmação histológica. Porém, não temos informações sobre o padrão histológico dos pacientes no presente estudo antes do início do tratamento com modulação hormonal. Dessa forma, não foi possível comparar a evolução que o estímulo para elevação dos níveis de TIT provocou na espermatogênese.

Em uma publicação recente, Peng et al. demonstraram maiores chances de recuperação espermática com o uso de gonadotrofina exógena previamente a micro-TESE para pacientes com ANO (31,2% vs. 19,5%, $P=0,006$) [Peng et al., 2022]. Por meio de regressões logísticas bruta e ajustada se confirmaram maiores chances de recuperação espermática com o uso de tratamento hormonal prévio a micro-TESE (OR bruto: 1,87, IC 95%, 1,22-2,92; OR ajustado: 1,64, IC 95%, 1,03-2,63). Neste estudo, o grupo tratado era composto de 395 pacientes e recebeu hCG (formulação não mencionada) combinado ou não com FSH urinário altamente purificado por 3 meses, enquanto outros 174 pacientes não receberam tratamento e foram comparados como grupo controle. Entretanto, o diagnóstico de ANO foi clínico, sem avaliação histopatológica, nem mesmo a variação dos níveis de testosterona com o tratamento hormonal.

Até o momento presente, nenhum estudo randomizado controlado foi publicado avaliando regimes de estimulação hormonal com gonadotrofinas. A interpretação dos resultados expostos nos diversos trabalhos deve ser analisada com cautela. Uma recente

metanálise compilou 10 estudos controlados com variados tipos de modulação hormonal que somou 985 pacientes [Tharakan et al., 2022]. A taxa de sucesso na recuperação espermática foi maior em pacientes que receberam estimulação hormonal prévia a cirurgia de recuperação espermática comparado aos pacientes que não receberam tratamento (OR 1,96, IC 95% 1,08-3,56, $P=0,03$). Neste mesmo estudo, os autores avaliaram subgrupos de pacientes com ANO entre normogonadotrófico e hipergonadotrófico, tendo como limiar de FSH igual a 12 UI/L. Enquanto o grupo normogonadotrófico apresentou significativamente maiores chances de sucesso na recuperação espermática com a modulação hormonal (OR 2,13, IC 95% 1,10-4,14%, $P=0,02$), pacientes hipergonadotróficos não demonstraram o mesmo cenário positivo (OR 1,73, IC 95% 0,44-6,77). No presente estudo, tanto os pacientes normogonadotróficos quanto hipergonadotróficos apresentaram benefício da estimulação hormonal prévia a micro-TESE num modelo não-ajustado. Porém, após ajuste do modelo levando em consideração o conjunto de variáveis independentes, o benefício da estimulação hormonal somente se manteve no grupo normogonadotrófico, corroborando os achados de Tharakan et al. O fato de pacientes com parada de maturação poderem apresentar níveis de FSH normais somado ao fato de apenas esse padrão histológico ter demonstrado benefício da estimulação hormonal com gonadotrofinas na maior recuperação espermática, corrobora para o achado do subgrupo de pacientes com hipogonadismo normogonadotrófico apresentar resultado melhores com a estimulação de gonadotrofinas para maior taxa de recuperação espermática. Ademais, pacientes com padrão histológico também podem apresentar níveis de $FSH < 12$ UI/L, sugerindo melhor reserva testicular [Punjani et al., 2021b].

5.5. Efeitos adversos e complicações

Apesar dos benefícios associados ao uso de gonadotrofinas para maior sucesso na recuperação espermática, esses medicamentos não foram isentos de efeitos colaterais. Diversos trabalhos que utilizaram gonadotrofina para elevação dos níveis de TIT demonstraram baixas taxas de efeitos adversos, variando de 0-16% [Shiraishi et al., 2012; Hussein et al., 2013; Shiraishi et al., 2014; Kobori et al., 2015; Shiraishi et al., 2016; Gul et al., 2016]. De forma semelhante, as taxas de efeito adversos no presente estudo foram de 10,3%, sendo as principais queixas: reações locais a aplicação do medicamento (5,1%) e a mastalgia (1,4%). Todos os pacientes que apresentaram ginecomastia e mastalgia receberam inibidor de aromatase a fim de reduzir níveis séricos de estradiol e corrigir a relação TT/E2. Houve boa resposta ao tratamento com resolução do efeito adverso em 6 de 7 pacientes. O único paciente que manteve quadro de ginecomastia mesmo em uso de inibidor de aromatase optou por manter o esquema de

tratamento com gonadotrofinas. Os três casos com ginecomastia apresentaram como grau 1, o que corresponde apenas ao aumento do diâmetro e protrusão limitada da região areolar [Cordova et al., 2008]. Nenhum paciente interrompeu o tratamento durante o estudo por qualquer efeito adverso presente.

Além dos efeitos adversos relacionados a administração de gonadotrofinas, avaliamos as taxas de complicações precoces do procedimento de micro-TESE. As principais complicações registradas eram discretas como dor persistente, infecção e hematoma. No presente estudo, a taxa de complicações pós-operatórias da micro-TESE foi de 2,3% (14/616), predominando quadro de infecção do sítio cirúrgico superficial ou profundo e hematoma. Em um trabalho de revisão recentemente publicado, os autores analisaram 29 estudos com um total de 1251 pacientes que demonstrou uma taxa de complicação pós-operatória da micro-TESE de 2,6% (variando de 0 a 10%) [Achermann et al., 2021b]. Dessa forma, a taxa de complicação precoce relacionada a micro-TESE no presente estudo esteve dentro do relatado na literatura.

No mesmo estudo de revisão anteriormente citado, os autores avaliaram todos os oito estudos controlados na literatura que compararam as técnicas de micro-TESE e TESE convencional quanto as taxas de sucesso na recuperação espermática, assim como as taxas de complicações precoces atribuídas aos procedimentos cirúrgicos [Achermann et al., 2021b]. A média nas taxas de complicações relacionadas ao procedimento de TESE convencional foi de 3,0% (8/269). Dessa forma, as taxas de complicações da micro-TESE no presente estudo foram inferiores aquelas reportadas para o procedimento de TESE convencional.

5.6. Limitações

Este estudo apresentou diversas limitações. Primeiramente pela natureza do estudo ser observacional. Ensaio clínico randomizado constitui o padrão-ouro para avaliar a eficácia do tratamento com gonadotrofinas para homens com ANO; entretanto, faltam estudos desta natureza. Utilizamos dados do mundo real coletados de forma prospectiva e com rigor metodológico a fim de minimizar o comprometimento nas interpretações dos resultados obtidos. Embora alguns parâmetros demográficos e clínicos dos pacientes tratados e não tratados diferiram, as análises de regressão logística ajustaram o efeito destas covariáveis e identificaram associações entre parâmetros clínicos e laboratoriais e as taxas de sucesso na recuperação espermática, tanto no grupo total quanto no grupo tratado. Tais análises também permitiram traçar um perfil do paciente com ANO e hipogonadismo bioquímico que mais se beneficiaria desse tratamento prévio a micro-TESE. Dos modelos de regressão logística existentes, a técnica de LASSO foi a utilizada no presente estudo diante do grande número de

covariáveis presentes, o que permitiu analisá-las simultaneamente [Tibshirani, 1996]. O método LASSO permite identificar as variáveis relevantes, removendo aquelas redundantes (colineares), aumentando assim a acurácia da predição. Além disso, o método permite a obtenção da razão das chances ajustada para cada variável estudada, que leva em consideração o efeito de todas as covariáveis incluídas no modelo, tornando os resultados mais confiáveis e interpretáveis.

Outra limitação está atrelada ao valor de referência de testosterona total utilizado neste estudo para definir hipogonadismo bioquímico que foi de 350 ng/dL. Embora tal limiar tem sido utilizado pela maioria das sociedades médicas internacionais como a Associação Europeia de Urologia (EAU), a Academia Europeia de Andrologia (EAA), a Sociedade Internacional de Medicina Sexual (ISSM), a Sociedade Britânica de Medicina Sexual (BSSM) e a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), algumas entidades utilizam o valor de corte igual ou inferior a 300 ng/dL, como a Associação Americana de Urologia (AUA) e a Sociedade de Endocrinologia (ES) [Salter et al., 2019; Giagulli et al., 2020]. Entretanto, em um estudo populacional que avaliou os níveis de testosterona total de 456 homens jovens (com idade entre 19 e 40 anos) não obesos, os autores demonstraram que o percentil 2,5 apresentou nível de testosterona total de 348 ng/dL [Bhasin et al., 2011], valor de corte que tem sido endossado pela maioria das entidades mencionadas acima.

A fim de não comprometer a interpretação dos resultados do estudo pela influência da variação circadiana dos hormônios reprodutivos, as coletas de exames hormonais no presente estudo foram padronizadas, tendo ocorrido entre 8h e 10h pela manhã e após jejum noturno [Gupta et al., 2000; Wu et al., 2010; Salonia et al., 2021]. A inclusão de pacientes com ANO potencialmente elegíveis para tratamento hormonal baseou-se exclusivamente no diagnóstico de hipogonadismo bioquímico pelo método de quimioluminescência (ECLIA), não sendo coletado dados quanto a presença de sintomas de hipogonadismo. O método de ECLIA é o mais usado em pesquisas por causa da simplicidade técnica, pequeno volume de amostra necessária para análise, baixo custo e rápido resultado [Handelsman, 2017]. Apesar do método de referência para análise dos níveis séricos de testosterona ser fundamentada pela cromatografia líquida de alta performance como método preparativo e espectrometria de massa em tandem para quantificação, há importante limitação do uso desse método pelo alto custo dos equipamentos necessários e a expertise necessária para sua realização [Vieira et al., 2008]. O método utilizado no presente estudo de ECLIA tem demonstrado boa correlação com as análises por espectrometria de massa [Huhtaniemi et al., 2012; Salonia et al., 2021]. Huhtaniemi et al. avaliaram 3174 homens europeus entre 40 e 79 anos e compararam ambos os métodos

laboratoriais para análise de testosterona sérica e estradiol [Huhtaniemi et al., 2012]. Os autores demonstraram alta correlação entre os métodos de imunoensaio e espectrometria de massa para análise de testosterona sérica ($r=0,93$, $P<0,001$). Por meio de regressão de Deming, a correlação entre os métodos para níveis de testosterona $>8\text{nmol/L}$ foi próxima do ideal (0,97, IC 95% 0,95-0,99).

Os efeitos tardios atrelados ao procedimento de micro-TESE quanto ao perfil hormonal dos pacientes não foram investigados de forma sistemática no presente estudo. Embora os pacientes tenham sido avaliados rotineiramente no pós-operatório com a coleta de dados relacionados as complicações cirúrgicas precoces, não foram avaliados de forma pormenorizada quanto a variação dos níveis de testosterona após a cirurgia de recuperação espermática. Komori et al. demonstraram a possibilidade de redução temporária dos níveis séricos de testosterona pós micro-TESE com retorno aos níveis basais após 12 meses na maioria dos casos [Komori et al., 2004]. Porém, pacientes com níveis séricos de testosterona baixos prévio à recuperação cirúrgica de espermatozoides, assim como com testículos hipotróficos, apresentam risco maior de tratamento permanente de reposição de testosterona no pós-operatório [Achermann et al., 2021b]. Dentre as técnicas de recuperação espermática mais realizadas em pacientes com ANO, a micro-TESE apresenta menores taxas de complicações, como hematoma escrotal, infecções, dor, epididimite e hidrocele, comparada a TESE convencional (1,3% vs. 3,0%) [Achermann et al., 2021b].

A terapia hormonal utilizada no presente estudo baseou-se exclusivamente em gonadotrofinas recombinantes, particularmente o hCG recombinante, sendo o esquema de tratamento combinado ou não com FSH recombinante. A literatura é escassa e relativamente recente quanto a avaliação dos efeitos de gonadotrofinas recombinantes sobre a espermatogênese em pacientes com ANO [Laursen et al., 2019; Sen et al., 2020; Laursen et al., 2022; Andrabi et al., 2022]. A maioria dos estudos utilizam gonadotrofinas urinárias, não havendo consenso na literatura quanto a potenciais vantagens das formas recombinantes comparado aos produtos urinários [Leão et al., 2014; Laursen et al., 2022; Esteves et al., 2022]. Entretanto, num estudo de revisão comparando a eficácia, eficiência e efetividade dos variados tipos de gonadotrofinas no tratamento de infertilidade, Esteves demonstrou a diferença de pureza de FSH presente entre as gonadotrofinas extraídas de urina de mulheres pós menopausa, FSH urinário altamente purificado e rec-FSH. Enquanto menos de 5% das gonadotrofinas extraídas de mulheres pós menopausa apresentam a forma pura de FSH, o preparo de FSH urinário altamente purificado apresenta menos de 70% e as formas de rec-FSH mais de 99% [Esteves, 2015b]. As metanálises sobre a eficácia das variadas formas de gonadotrofinas quanto

a estimulação ovariana tem demonstrado maior número de óvulos captados com o uso de rec-FSH comparado as formas urinárias, além da primeira apresentar melhor custo-benefício [Esteves, 2015b]. Dessa forma, postula-se que o uso de gonadotrofinas recombinantes possa apresentar melhores resultados na espermatogênese comparado a ação de gonadotrofinas urinárias.

A administração dos medicamentos foi por via subcutânea com dispositivo de autoaplicação. Essa via de administração permite maior adesão ao tratamento devido a maior tolerabilidade e menos dor comparado a via intramuscular [Alviggi et al., 2007]. Além disso, não houve necessidade do paciente se deslocar a clínicas ou hospitais para aplicação [Esteves, 2015b]. Apenas a primeira injeção foi administrada na instituição, pelo médico ou enfermeira, que ensinou o paciente a como proceder as demais aplicações de forma fracionada usando o dispositivo em casa e como armazená-los. De acordo com a fabricante, o medicamento é indicado para uso único, sendo estimado neste estudo que o fracionamento em subdoses seja regular, isto é, para cada clique do dispositivo estaria sendo fornecido 10 mcg (~260 UI) de rec-hCG, uma vez que este dispositivo apresenta 250 mcg (6.500 UI) com 25 cliques. Além disso, o tempo de tratamento hormonal foi relativamente longo, e em cerca de 1/3 dos pacientes houve associação do FSH recombinante em uma dose fixa. Ao contrário do dispositivo de hCG recombinante em que o fabricante recomenda uso único, a caneta de FSH recombinante tem a possibilidade de fracionamento de doses que são demonstradas no visor do próprio dispositivo. Cuidado deve ser praticado na interpretação dos resultados, uma vez que tratamentos mais longos e utilizando outras doses não foram explorados no presente estudo.

Nosso estudo dependeu primariamente da micro-TESE como técnica de recuperação de espermatozoides, tendo sido realizada por cirurgiões experientes. A técnica de micro-TESE é considerada padrão-ouro pela sua eficácia com maior capacidade de recuperação espermática e menores complicações comparada as demais técnicas existentes indicadas para pacientes com ANO [Bernie et al., 2015; Esteves et al., 2020; Achermann et al., 2021b]. O procedimento de micro-TESE foi considerado positivo quando pelo menos um espermatozoide viável para ICSI fosse encontrado. Para isso, todo processamento do parênquima testicular seguiu as técnicas mais avançadas disponíveis, realizadas por embriologistas com larga experiência na manipulação de tecido testicular. Dessa forma, minimizamos as possibilidades de falhas na recuperação espermática.

Apesar da forte associação entre padrão histológico com prognóstico de recuperação espermática, é essencial a compreensão de que a biópsia testicular não necessariamente corresponda a todo o testículo [Esteves et al., 2011a; Miyaoka et al., 2019;

[Achermann et al., 2021b](#); [Punjani et al., 2021b](#)]. Há casos de padrão misto com focos de hipoespermatogênese e outras de SCO em um mesmo testículo. No presente estudo, as amostras de biópsia testicular foram coletadas durante o procedimento de micro-TESE, fixadas em solução de Bouin e analisadas em um laboratório de histopatologia credenciado pela instituição. Na ausência de padrão histológico prévio ao início do tratamento endócrino, não foi possível avaliar uma evolução histológica como possível consequência do tratamento. Nos casos de padrão misto, utilizamos a forma predominante para análise dos resultados. Laudos com padrão de parada de maturação foram diferenciados entre a presença apenas de espermatogônias ou espermatócitos primários, como parada de maturação precoce, e espermatócitos secundários ou espermatídes para casos de parada de maturação tardia.

Por fim, o presente estudo não comparou as taxas de sucesso quanto a fertilização, desenvolvimento embrionário, taxas de implantação, abortos ou nascidos vivos entre os espermatozoides obtidos no grupo tratado do grupo não tratado. Os objetivos primários e secundários se limitaram a avaliar fatores associados à recuperação dos espermatozoides e não ao desempenho desses gametas no processo de fertilização. Porém, dados da literatura sugerem menor taxa de nascidos vivos após uso de espermatozoides de pacientes com ANO em procedimento de ICSI comparado a outros pacientes sem falência testicular [[Esteves et al., 2013b](#); [Esteves et al., 2014](#); [Meijerink et al., 2016](#); [Esteves et al., 2018](#); [Miyaoka et al., 2019](#)]. Em um estudo retrospectivo, realizados com dados da própria instituição onde o presente estudo foi realizado, [Esteves et al.](#) compararam as taxas de nascidos vivos após ICSI de espermatozoides obtidos por micro-TESE de 365 homens com ANO, 40 amostras de banco de sêmen e 146 homens com AO. A taxa de nascidos vivos foi menor em homens com ANO (19,9%) comparado a doador de sêmen (37,5%; OR ajustado: 0,377, IC 95% 0,233-0,609, $P<0,001$) e a homens com AO (34,2%; OR ajustado: 0,403, IC 95% 0,241-0,676, $P=0,001$) [[Esteves et al., 2014](#)]. No entanto, os parâmetros neonatais não diferiram entre os grupos.

5.7. Perspectivas futuras

Apesar dos resultados do presente estudo e da literatura existente sugerir benefício da estimulação hormonal para aumentar as taxas de recuperação espermática em pacientes com ANO, tal evidência é baseada em estudos de corte com nível de evidência que varia entre muito baixo à moderado [[Tharakan et al., 2022](#)]. Pesquisas futuras, na forma de estudos prospectivos e ensaios randomizados, são necessárias para confirmar tais resultados e estabelecer protocolos padronizados para a estimulação hormonal. Esses protocolos podem incluir a otimização de dosagens, combinações de medicamentos ou o desenvolvimento de novas abordagens.

A individualização do tratamento com base nas características específicas de cada paciente e a identificação de fatores preditores são essenciais. Essas abordagens personalizadas permitiriam determinar quais pacientes responderiam melhor à estimulação hormonal, otimizando, assim, o custo-benefício do tratamento. Estudos a longo prazo sobre o uso de gonadotrofinas recombinantes são cruciais para avaliar a segurança e os efeitos colaterais associados ao tratamento. Além disso, o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e específicos para a estimulação da espermatogênese é uma perspectiva importante para o futuro.

Após a obtenção de espermatozoides, surgem dúvidas quanto à influência da estimulação hormonal no sucesso das taxas de fertilização, implantação embrionária e, principalmente, nas taxas de gravidez clínica e nascidos vivos. A estimulação hormonal com hCG urinário por 3 meses em 134 pacientes com síndrome de Klinefelter não-mosaicos não demonstrou superioridade estatística comparado aos 50 pacientes sem tratamento em relação a taxas de fertilização, transferência embrionária, taxas de implantação, gravidez clínica e nascidos vivos [Guo et al., 2020]. Resultados semelhantes foram observados em um estudo retrospectivo de coorte conduzido por Peng et al., que não encontrou diferenças nas taxas de fertilização, formação de blastocistos, gravidez clínica, nascidos vivos ou abortos entre o grupo de pacientes com ANO submetido à estimulação hormonal com gonadotrofinas urinárias antes da micro-TESE e o grupo controle [Peng et al., 2022]. Em relação aos efeitos da estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes nos resultados de ICSI para pacientes com ANO, as informações são limitadas a relatos de casos [Laursen et al., 2019; Laursen et al., 2022].

6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que a estimulação hormonal em homens com ANO e hipogonadismo bioquímico por meio de terapia com gonadotrofinas recombinantes previamente a micro-TESE contribui com maiores chances de sucesso na recuperação espermática.

A estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes previamente a micro-TESE, o padrão histológico com sinais de espermatogênese, história de varicocelectomia prévia, ausência de varicocele clínica e níveis basais de FSH se demonstraram preditores para o sucesso da recuperação espermática pela técnica de micro-TESE. Com relação aos pacientes tratados com gonadotrofinas recombinantes, os preditores de sucesso para recuperação espermática foram os níveis de testosterona sérica total prévio a micro-TESE, o delta de testosterona e o padrão histológico testicular.

Utilizando como limite 12 UI/L como valores normais de FSH basal, tanto os pacientes com ANO e hipogonadismo normogonadotróficos quanto aqueles com hipogonadismo hipergonadotróficos se beneficiam com a modulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes previamente a micro-TESE ao apresentarem maiores taxas de sucesso na recuperação espermática comparado ao grupo não tratado. Entretanto, após ajuste do modelo de regressão levando em consideração o possível impacto das variáveis independentes, a significância estatística na razão de chances da recuperação espermática somente se manteve no grupo normogonadotrófico.

De forma geral, os pacientes com hipoespermatogênese tiveram maiores taxas de sucesso na recuperação espermática, seguido por aqueles com parada de maturação e Sertoli *cell-only*. Porém, comparando os padrões histológicos quanto a ação da estimulação hormonal, apenas pacientes com parada de maturação demonstraram maiores taxas de recuperação espermática após terapia hormonal, sendo o subgrupo com parada de maturação em estágio mais avançado os que mais se beneficiaram comparado àqueles com parada de maturação em estágio iniciais.

Sugere-se que a estimulação hormonal com gonadotrofinas recombinantes possa ser considerada um tratamento eficaz e seguro para pacientes com ANO e hipogonadismo bioquímico buscando paternidade biológica.

As taxas de efeitos adversos a administração dos medicamentos e as complicações atribuídas ao procedimento de micro-TESE são baixas e toleráveis na grande maioria dos casos. No entanto, as evidências para confirmar tais achados são mínimos e estudos em larga escala,

multicêntricos e randomizados são necessários para determinar a eficácia e segurança da estimulação hormonal prévio a cirurgia de recuperação espermática.

7. REFERÊNCIAS

1. Abdullah L, Bondagji N. Histopathological patterns of testicular biopsy in male infertility: A retrospective study from a tertiary care center in the western part of Saudi Arabia. *Urol Ann.* 2011 Jan;3(1):19-23.
2. Achermann APP, Esteves SC. Diagnosis and management of infertility due to ejaculatory duct obstruction: summary evidence. *Int Braz J Urol.* 2021a Jul-Aug;47(4):868-881.
3. Achermann APP, Pereira TA, Esteves SC. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) in men with infertility due to nonobstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol.* 2021b Nov;53(11):2193-2210.
4. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol.* 2012 Dec;9(12):678-90.
5. Alviggi C, Revelli A, Anserini P, Ranieri A, Fedele L, Strina I, et al. A prospective, randomised, controlled clinical study on the assessment of tolerability and of clinical efficacy of Merional (hMG-IBSA) administered subcutaneously versus Merional administered intramuscularly in women undergoing multifollicular ovarian stimulation in an ART programme (IVF). *Reprod Biol Endocrinol.* 2007 Dec 4;5:45.
6. Andrabi SW, Saini P, Joshi M, Mehta P, Makker GC, Mishra G, et al. HCG therapy in azoospermic men with lower or borderline testosterone levels and the prognostic value of Y-deletion analysis in its outcome. *Andrologia* 2022;54(1):e14251.
7. Andrade DL, Viana MC, Esteves SC. Differential Diagnosis of Azoospermia in Men with Infertility. *J Clin Med.* 2021 Jul 16;10(14):3144.
8. Arshad MA, Majzoub A, Esteves SC. Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol.* 2020 Nov;52(11):2015-2038.
9. Ashraf MC, Singh S, Raj D, Ramakrishnan S, Esteves SC. Micro-dissection testicular sperm extraction as an alternative for sperm acquisition in the most difficult cases of Azoospermia: Technique and preliminary results in India. *J Hum Reprod Sci.* 2013 Apr;6(2):111-23.

10. Barbotin AL, Ballot C, Sigala J, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, et al. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jun;172(6):669-76.
11. Bauman WA, La Fountaine MF, Cirmigliaro CM, Kirshblum SC, Spungen AM. Testicular responses to hCG stimulation at varying doses in men with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2017 Jul;55(7):659-663.
12. Benson K, Hartz AJ. A comparison of observational studies and randomized, controlled trials. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1878-86.
13. Bernie AM, Mata DA, Ramasamy R, Schlegel PN. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015 Nov;104(5):1099-103.e1-3.
14. Bhasin S, Pencina M, Jasuja GK, Travison TG, Coviello A, Orwoll E, et al. Reference ranges for testosterone in men generated using liquid chromatography tandem mass spectrometry in a community-based sample of healthy nonobese young men in the Framingham Heart Study and applied to three geographically distinct cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;96(8):2430-9.
15. Buvat J, Maggi M, Guay A, Torres LO. Testosterone deficiency in men: systematic review and standard operating procedures for diagnosis and treatment. *J Sex Med*. 2013 Jan;10(1):245-84.
16. Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, Barbagallo F, Calogero AE, La Vignera S. Effects of the selective estrogen receptor modulators for the treatment of male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019 Aug;20(12):1517-1525.
17. Cannarella R, Shah R, Hamoda TAA, Boitrelle F, Saleh R, Gul M, Rambhatla A, Kavoussi P, Toprak T, Harraz AM, Ko E, Çeker G, Durairajanayagam D, Alkahidi N, Kuroda S, Crafa A, Henkel R, Salvio G, Hazir B, Darbandi M, Bendayan M, Darbandi S, Falcone M, Garrido N, Kosgi R, Sawaid Kaiyal R, Karna K, Phuoc NHV, Birowo P, Colpi GM, de la Rosette J, Pinggera GM, Nguyen Q, Zini A, Zohdy W, Singh R, Saini P, Glina S, Lin H, Mostafa T, Rojas-Cruz C, Arafa M, Calogero AE, Dimitriadis F, Kothari P, Karthikeyan VS, Okada K, Chiba K, Kadioglu A, Altay B, Turunc T, Zilaitiene B, Gokalp F, Adamyan A, Katz D, Chung E, Mierzwa TC, Zylbersztejn DS, Paul GM,

- Sofikitis N, Sokolakis I, Malhotra V, Brodjonegoro SR, Adriansjah R, Tsujimura A, Amano T, Balercia G, Ziouziou I, Deswanto IA, Martinez M, Park HJ, Bakırcıoglu ME, Ceyhan E, Aydos K, Ramsay J, Minhas S, Al Hashimi M, Ghayda RA, Tadros N, Sindhwani P, Ho CCK, Rachman RI, Rodriguez Pena M, Motawi A, Ponnusamy AK, Dipankar S, Amir A, Binsaleh S, Serefoglu EC, Banthia R, Khalafalla K, Basukarno A, Bac NH, Singla K, Ambar RF, Makarounis K, Priyadarshi S, Duarsa GWK, Atmoko W, Jindal S, Arianto E, Akhavizadegan H, El Bardisi H, Shoshany O, Busetto GM, Moussa M, Jamali M, Al-Marhoon MS, Ruzaev M, Farsi HMA, Mutambirwa S, Lee DS, Kulaksiz D, Cheng YS, Bouzouita A, Sarikaya S, Kandil H, Tsampoukas G, Farkouh A, Bowa K, Savira M, Mogharabian N, Le TV, Harjanggih M, Anh DT, Long TQT, Soebadi MA, Hakim L, Tanic M, Ari UC, Parikh FR, Calik G, Kv V, Dorji G, Rezano A, Rajmil O, Tien DMB, Yuan Y, Lizarraga-Salas JF, Eze B, Ngoo KS, Lee J, Arslan U, Agarwal A; Global Andrology Forum. Does Varicocele Repair Improve Conventional Semen Parameters? A Meta-Analytic Study of Before-After Data. *World J Mens Health*. 2023 Jun 22.
18. Caroppo E, Colpi GM. Hormonal Treatment of Men with Nonobstructive Azoospermia: What Does the Evidence Suggest? *J Clin Med*. 2021 Jan 20;10(3):387.
 19. Caroppo E, Colpi GM. Successful Bilateral Sperm Retrieval in a Hypogonadal Patient with Non-Obstructive Azoospermia Showing Normal Serum 17-Hydroxyprogesterone Levels Suggestive of Normal Intratesticular Testosterone Production: A Case Report. *J Clin Med*. 2023 May 22;12(10):3594.
 20. Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod*. 2006 Apr;21(4):847-51.
 21. Cerilli LA, Kuang W, Rogers D. A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Aug;134(8):1197-204.
 22. Chiba K, Enatsu N, Fujisawa M. Management of non-obstructive azoospermia. *Reprod Med Biol*. 2016 Jan 18;15(3):165-173.
 23. Christin-Maitre S, Young J. Androgens and spermatogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2022 Jun;83(3):155-158.

24. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):15-26.
25. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM, et al. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl*. 2006 Jul-Aug;27(4):483-90.
26. Cordova A, Moschella F. Algorithm for clinical evaluation and surgical treatment of gynaecomastia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008;61(1):41-9.
27. Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019 Nov 5;25(6):733-757.
28. Coviello AD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Herbst KL, Amory JK, Anawalt BD, et al. Low-dose human chorionic gonadotropin maintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 May;90(5):2595-602.
29. Crosnoe LE, Grober E, Ohl D, Kim ED. Exogenous testosterone: a preventable cause of male infertility. *Transl Androl Urol*. 2013 Jun;2(2):106-13.
30. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, Forbes JF; ATAC/LATTE investigators. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2010 Dec;11(12):1135-41.
31. Çayan S, Yaman O. Administration of Pharmaceutical Agents Prior to Testicular Sperm Extraction Procedures: A Meaningful or Meaningless Approach? *Curr Pharm Des*. 2021;27(23):2692-2696.
32. de Hond AAH, Steyerberg EW, van Calster B. Interpreting area under the receiver operating characteristic curve. *Lancet Digit Health*. 2022 Dec;4(12):e853-e855.
33. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl*. 2012 Jan;14(1):88-93.
34. Dreyer NA, Bryant A, Velentgas P. The GRACE Checklist: A Validated Assessment Tool for High Quality Observational Studies of Comparative Effectiveness. *J Manag Care Spec Pharm*. 2016 Oct;22(10):1107-13.
35. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 1970 Aug;21(8):606-9.

36. Eken A, Gulec F. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE): Predictive value of preoperative hormonal levels and pathology in non-obstructive azoospermia. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018 Feb;34(2):103-108.
37. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl*. 2015a May-Jun;17(3):459-70.
38. Esteves, SC. Efficacy, efficiency and effectiveness of gonadotropin therapy for infertility treatment. *MedicalExpress (São Paulo, online)*. 2015b;2(3):M150302.
39. Esteves SC, Achermann APP, Simoni M, Santi D, Casarini L. Male infertility and gonadotropin treatment: What can we learn from real-world data? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2023 Feb;86:102310.
40. Esteves SC, Agarwal A. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013b;68 Suppl 1(Suppl 1):141-50.
41. Esteves SC, Agarwal A. The azoospermic male: current knowledge and future perspectives. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013a;68 Suppl 1(Suppl 1):1-4.
42. Esteves SC, Bento FC. Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the Brazilian Cells and Germinative Tissue Directive. *Reprod Biomed Online*. 2013 Jan;26(1):9-21.
43. Esteves SC, Humaidan P, Ubaldi FM, Alviggi C, Antonio L, Barratt CLR, Behre HM, Jørgensen N, Pacey AA, Simoni M, Santi D. APHRODITE criteria: addressing male patients with hypogonadism and/or infertility owing to altered idiopathic testicular function. *Reprod Biomed Online*. 2024 Apr;48(4):103647.
44. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. [corrected]. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011a;66(4):691-700.
45. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol*. 2011b Sep-Oct;37(5):570-83.
46. Esteves SC, Miyaoka R, Roque M, Agarwal A. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2016 Mar-Apr;18(2):246-53.
47. Esteves SC, Prudencio C, Seol B, Verza S, Knoedler C, Agarwal A. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility. *Asian J Androl*. 2014 Jul-Aug;16(4):602-6.

48. Esteves SC, Ramasamy R, Colpi GM, Carvalho JF, Schlegel PN. Sperm retrieval rates by micro-TESE versus conventional TESE in men with non-obstructive azoospermia-the assumption of independence in effect sizes might lead to misleading conclusions. *Hum Reprod Update*. 2020 Jun 18;26(4):603-605.
49. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Hum Reprod*. 1998 Dec;13(12):3384-9.
50. Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Jul;40(7):985-92.
51. Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, Haahr T, Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol*. 2018 Sep;15(9):535-562.
52. Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome. *J Hum Reprod Sci*. 2012 Sep;5(3):233-43.
53. Esteves SC, Yarali H, Ubaldi FM, Carvalho JF, Bento FC, Vaiarelli A, et al. Validation of ART Calculator for Predicting the Number of Metaphase II Oocytes Required for Obtaining at Least One Euploid Blastocyst for Transfer in Couples Undergoing *in vitro* Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jan 24;10:917.
54. Ezcurra D, Humaidan P. A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Oct 3;12:95.
55. Fink J, Schoenfeld BJ, Hackney AC, Maekawa T, Horie S. Human chorionic gonadotropin treatment: a viable option for management of secondary hypogonadism and male infertility. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2021 Jan;16(1):1-8.
56. Ford I, Norrie J. Pragmatic Trials. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):454-63.
57. Foresta C, Bettella A, Spolaore D, Merico M, Rossato M, Ferlin A. Suppression of the high endogenous levels of plasma FSH in infertile men are associated with

- improved Sertoli cell function as reflected by elevated levels of plasma inhibin B. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1431-7.
58. Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC. Hypogonadotropic hypogonadism revisited. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):81-8.
 59. França MM, Lerario AM, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, de Mello MP, et al. A Novel Homozygous Missense FSHR Variant Associated with Hypergonadotropic Hypogonadism in Two Siblings from a Brazilian Family. *Sex Dev.* 2017;11(3):137-142.
 60. Giagulli VA, Castellana M, Lisco G, Triggiani V. Critical evaluation of different available guidelines for late-onset hypogonadism. *Andrology.* 2020 Nov;8(6):1628-1641.
 61. Gnanaprakasam MS, Chen CJ, Sutherland JG, Bhalla VK. Receptor depletion and replenishment processes: in vivo regulation of gonadotropin receptors by luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and ethanol in rat testis. *Biol Reprod.* 1979 Jun;20(5):991-1000.
 62. Gregoriou O, Bakas P, Grigoriadis C, Creatsa M, Hassiakos D, Creatsas G. Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. *Fertil Steril.* 2012 Jul;98(1):48-51.
 63. Gudeloglu A, Parekattil SJ. Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):27-34.
 64. Gul U., Turunç T. The effect of human chorionic gonadotropin treatment before testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *J Clin Anal Med.* 2016;7(1): 55-9.
 65. Guo F, Fang A, Fan Y, Fu X, Lan Y, Liu M, et al. Role of treatment with human chorionic gonadotropin and clinical parameters on testicular sperm recovery with microdissection testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection outcomes in 184 Klinefelter syndrome patients. *Fertil Steril.* 2020 Nov;114(5):997-1005.
 66. Gupta SK, Lindemulder EA, Sathyan G. Modeling of circadian testosterone in healthy men and hypogonadal men. *J Clin Pharmacol.* 2000 Jul;40(7):731-8.
 67. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):39-60.

68. Handelsman DJ. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science. *Hum Reprod.* 2017 Jun 1;32(6):1147-1150.
69. Hayden R, Tanrikut C. Detection and Management of Obstructive Azoospermia. *Urol Pract.* 2015 Jan;2(1):33-37.
70. Herati AS, Kohn TP, Kassiri B. New frontiers in fertility preservation: a hypothesis on fertility optimization in men with hypergonadotrophic hypogonadism. *Transl Androl Urol.* 2020 Mar;9(Suppl 2):S171-S177.
71. Heráček J, Sobotka V, Kolátorová L, Kočárek J, Hampl R. Serum and intratesticular sex steroids in azoospermic men: how do they correlate? *Physiol Res.* 2018 Nov 28;67(Suppl 3):S521-S524.
72. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 14;1:107.
73. Hu X, Ding Z, Hong Z, Zou Z, Feng Y, Zhu R, et al. Spermatogenesis improved by suppressing the high level of endogenous gonadotropins in idiopathic non-obstructive azoospermia: a case control pilot study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Sep 22;16(1):91.
74. Huhtaniemi I. A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. *Hormones (Athens).* 2015 Oct-Dec;14(4):468-78.
75. Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O'Neill TW, Finn JD, Bartfai G, Boonen S, Casanueva FF, Giwercman A, Han TS, Kula K, Labrie F, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Vanderschueren D, Forti G, Wu FC; EMAS Group. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol.* 2012 Jun;166(6):983-91.
76. Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Rao P, Niederberger C. Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study. *BJU Int.* 2013 Mar;111(3 Pt B):E110-4.
77. Jankowska K, Suszczewicz N, Rabijewski M, Dudek P, Zgliczyński W, Maksym RB. Inhibin-B and FSH Are Good Indicators of Spermatogenesis but Not the Best Indicators of Fertility. *Life (Basel).* 2022 Mar 30;12(4):511.
78. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989 Jul;142(1):62-5.

79. Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017 Sep;14(9):523-533.
80. Kaltsas A, Markou E, Zachariou A, Dimitriadis F, Mamoulakis C, Andreadakis S, et al. Varicoceles in Men With Non-obstructive Azoospermia: The Dilemma to Operate or Not. *Front Reprod Health*. 2022 Apr 4;4:811487.
81. Kaltsas A, Markou E, Zachariou A, Dimitriadis F, Symeonidis EN, Zikopoulos A, et al. Evaluating the Predictive Value of Diagnostic Testicular Biopsy for Sperm Retrieval Outcomes in Men with Non-Obstructive Azoospermia. *J Pers Med*. 2023 Sep 7;13(9):1362.
82. Kato Y, Shiraishi K, Matsuyama H. Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy. *Andrology*. 2014 Sep;2(5):734-40.
83. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril*. 2006 Jan;85(1):128-34.
84. Keenan DM, Veldhuis JD. Divergent gonadotropin-gonadal dose-responsive coupling in healthy young and aging men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Feb;286(2):R381-9.
85. Keevil BG, Adaway J. Assessment of free testosterone concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Jun;190:207-211.
86. Kerr JB, Millar M, Maddocks S, Sharpe RM. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *Anat Rec*. 1993 Apr;235(4):547-59.
87. Klami R, Mankonen H, Perheentupa A. Successful microdissection testicular sperm extraction for men with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol*. 2018 Jun;18(2):137-142.
88. Kobori Y, Suzuki K, Iwahata T, Shin T, Sato R, Nishio K, et al. Induction of spermatogenesis by rhFSH for azoospermia due to spermatogenic dysfunction with maturation arrest: five case series. *Syst Biol Reprod Med*. 2015 Jun;61(3):168-70.
89. Komori K, Tsujimura A, Miura H, Shin M, Takada T, Honda M, et al. Serial follow-up study of serum testosterone and antisperm antibodies in patients with non-obstructive azoospermia after conventional or microdissection testicular sperm extraction. *Int J Androl*. 2004 Feb;27(1):32-6.

90. Kumar R. Medical management of non-obstructive azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):75-9.
91. Larose H, Kent T, Ma Q, Shami AN, Harerimana N, Li JZ, et al. Regulation of meiotic progression by Sertoli-cell androgen signaling. *Mol Biol Cell*. 2020 Dec 1;31(25):2841-2862.
92. Laursen RJ, Alsbjerg B, Elbaek HO, Povlsen BB, Jensen KBS, Lykkegaard J, et al. Recombinant gonadotropin therapy to improve spermatogenesis in nonobstructive azoospermic patients - A proof of concept study. *Int Braz J Urol*. 2022 May-Jun;48(3):471-481.
93. Laursen RJ, Elbaek HO, Povlsen BB, Lykkegaard J, Jensen KBS, Esteves SC, et al. Hormonal stimulation of spermatogenesis: a new way to treat the infertile male with non-obstructive azoospermia? *Int Urol Nephrol*. 2019 Mar;51(3):453-456.
94. Leão Rde B, Esteves SC. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(4):279-93.
95. Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, et al. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 2001 Jan;15(1):184-200.
96. Levalle OA, Zylbersztein C, Aszpis S, Mariani V, Ponzio R, Aranda C, et al. Serum luteinizing hormone pulsatility and intratesticular testosterone and oestradiol concentrations in idiopathic infertile men with high and normal follicle stimulating hormone serum concentrations. *Hum Reprod*. 1994 May;9(5):781-7.
97. Liguori G, Trombetta C, Garaffa G, Bucci S, Gattuccio I, Salamè L, et al. Color Doppler ultrasound investigation of varicocele. *World J Urol*. 2004 Nov;22(5):378-81.
98. Lima TFN, Patel P, Blachman-Braun R, Madhusoodanan V, Ramasamy R. Serum 17-Hydroxyprogesterone is a Potential Biomarker for Evaluating Intratesticular Testosterone. *J Urol*. 2020 Sep;204(3):551-556.
99. Liu F, Panagiotakos D. Real-world data: a brief review of the methods, applications, challenges and opportunities. *BMC Med Res Methodol*. 2022 Nov 5;22(1):287. Erratum in: *BMC Med Res Methodol*. 2023 May 2;23(1):109.

100. Lopes LS, Cury VN, Cha JD, Lampa Junior VM, Marques JL, Mizrahi FE, et al. Do assisted reproduction outcomes differ according to aetiology of obstructive azoospermia? *Andrologia*. 2020 Feb;52(1):e13425.
101. Madgar I, Dor J, Weissenberg R, Raviv G, Menashe Y, Levron J. Prognostic value of the clinical and laboratory evaluation in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome who are receiving assisted reproductive therapy. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1167-9.
102. Madhusoodanan V, Patel P, Lima TFN, Gondokusumo J, Lo E, Thirumavalavan N, Lipshultz LI, Ramasamy R. Human Chorionic Gonadotropin monotherapy for the treatment of hypogonadal symptoms in men with total testosterone > 300 ng/dL. *Int Braz J Urol*. 2019 Sep-Oct;45(5):1008-1012.
103. Matthiesson KL, McLachlan RI, O'Donnell L, Frydenberg M, Robertson DM, Stanton PG, et al. The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):3962-9.
104. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod*. 2007 Jan;22(1):2-16.
105. Mehmood S, Aldaweesh S, Junejo NN, Altaweel WM, Kattan SA, Alhathal N. Microdissection testicular sperm extraction: Overall results and impact of preoperative testosterone level on sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia. *Urol Ann*. 2019 Jul-Sep;11(3):287-293.
106. Meijerink AM, Cissen M, Mochtar MH, Fleischer K, Thoonen I, de Melker AA, et al. Prediction model for live birth in ICSI using testicular extracted sperm. *Hum Reprod*. 2016 Sep;31(9):1942-51.
107. Miller N, Biron-Shental T, Pasternak Y, Belenky M, Shefi S, Itsykson P, Berkovitz A. Fertility outcomes after extended searches for ejaculated spermatozoa in men with virtual azoospermia. *Fertil Steril*. 2017 Jun;107(6):1305-1311.
108. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, Cocci A, Corona G, Dimitropoulos K, Gül M, Hatzichristodoulou G, Jones TH, Kadioglu A, Martínez Salamanca JI, Milenkovic U, Modgil V, Russo GI,

- Serefoglu EC, Tharakan T, Verze P, Salonia A; EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*. 2021 Nov;80(5):603-620.
109. Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi S, Hellerstein MK, et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J Urol*. 2006 Jan;175(1):242-6; discussion 246.
 110. Miyaoka R, Esteves SC. A critical appraisal on the role of varicocele in male infertility. *Adv Urol*. 2012;2012:597495.
 111. Miyaoka R, Orosz JE, Achermann AP, Esteves SC. Methods of surgical sperm extraction and implications for assisted reproductive technology success. *Panminerva Med*. 2019 Jun;61(2):164-177.
 112. Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, Sonoda T, Itatani H, Sugao H, et al. Reduction of human and rat testicular follicle stimulating hormone receptors by human menopausal gonadotrophin in vivo and in vitro. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987 Jun;26(6):675-84.
 113. Namiki M, Okuyama A, Sonoda T, Miyake A, Aono T, Matsumoto K. Down-regulation of testicular follicle-stimulating hormone receptors by human menopausal gonadotropin in infertile men. *Fertil Steril*. 1985 Nov;44(5):710-2.
 114. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001 Sep-Oct;7(5):473-81.
 115. Nwabuobi C, Arlier S, Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Lockwood CJ, Kayisli UA. hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 22;18(10):2037.
 116. O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 1996 Oct;55(4):895-901.
 117. Oduwole OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Dec 14;9:763.
 118. Ohlander SJ, Lindgren MC, Lipshultz LI. Testosterone and Male Infertility. *Urol Clin North Am*. 2016 May;43(2):195-202.

119. Oka S, Shiraishi K, Matsuyama H. Effects of human chorionic gonadotropin on testicular interstitial tissues in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology*. 2017 Mar;5(2):232-239.
120. Peng T, Liao C, Ye X, Chen Z, Lan Y, Fu X, et al. Gonadotropins treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: a single-center cohort study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Apr 1;20(1):61.
121. Pilatz A, Altinkilic B, Köhler E, Marconi M, Weidner W. Color Doppler ultrasound imaging in varicoceles: is the venous diameter sufficient for predicting clinical and subclinical varicocele? *World J Urol*. 2011 Oct;29(5):645-50.
122. Punjani N, Flannigan R, Kang C, Khani F, Schlegel PN. Quantifying Heterogeneity of Testicular Histopathology in Men with Nonobstructive Azoospermia. *J Urol*. 2021b Nov;206(5):1268-1275.
123. Punjani N, Kang C, Schlegel PN. Two Decades from the Introduction of Microdissection Testicular Sperm Extraction: How This Surgical Technique Has Improved the Management of NOA. *J Clin Med*. 2021a Mar 29;10(7):1374.
124. Rajpert-De Meyts E, Grigor KM, Skakkebaek NE. Histopathological Evaluation of Testicular Biopsy. In: Simoni M, Huhtaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p.1-20.
125. Ramasamy R, Ricci JA, Palermo GD, Gosden LV, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *J Urol*. 2009 Sep;182(3):1108-13.
126. Reifsnyder JE, Ramasamy R, Hussein J, Schlegel PN. Role of optimizing testosterone before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *J Urol*. 2012 Aug;188(2):532-6.
127. Riccetti L, De Pascali F, Gilioli L, Potì F, Giva LB, Marino M, et al. Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017 Jan 5;15(1):2.
128. Romeo C, Santoro G. Free radicals in adolescent varicocele testis. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:912878.

129. Roth LW, Ryan AR, Meacham RB. Clomiphene citrate in the management of male infertility. *Semin Reprod Med.* 2013 Jul;31(4):245-50.
130. Roth MY, Lin K, Amory JK, Matsumoto AM, Anawalt BD, Snyder CN, et al. Serum LH correlates highly with intratesticular steroid levels in normal men. *J Androl.* 2010a Mar-Apr;31(2):138-45.
131. Roth MY, Page ST, Lin K, Anawalt BD, Matsumoto AM, Snyder CN, et al. Dose-dependent increase in intratesticular testosterone by very low-dose human chorionic gonadotropin in normal men with experimental gonadotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010b Aug;95(8):3806-13.
132. Rumbold AR, Sevoyan A, Oswald TK, Fernandez RC, Davies MJ, Moore VM. Impact of male factor infertility on offspring health and development. *Fertil Steril.* 2019 Jun;111(6):1047-1053.
133. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol.* 2010 May;205(2):117-31.
134. Salonia A, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, Cocci A, Corona G, Dimitropoulos K, Gül M, Hatzichristodoulou G, Jones TH, Kadioglu A, Martínez Salamanca JI, Milenkovic U, Modgil V, Russo GI, Serefoglu EC, Tharakan T, Verze P, Minhas S; EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health. European Association of Urology Guidelines on Sexual and Reproductive Health-2021 Update: Male Sexual Dysfunction. *Eur Urol.* 2021 Sep;80(3):333-357.
135. Salonia A, Rastrelli G, Hackett G, Seminara SB, Huhtaniemi IT, Rey RA, et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 May 30;5(1):38.
136. Salter CA, Mulhall JP. Guideline of guidelines: testosterone therapy for testosterone deficiency. *BJU Int.* 2019 Nov;124(5):722-729.
137. Santi D, Crépieux P, Reiter E, Spaggiari G, Brigante G, Casarini L, et al. Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *J Clin Med.* 2020 Apr 3;9(4):1014.
138. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod.* 1999 Jan;14(1):131-5.
139. Schlegel PN. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(5):561-72.

140. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. *Fertil Steril*. 2021 Jan;115(1):54-61.
141. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, et al. Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline part II. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):44-51.
142. Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, Ross LS. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol*. 2002 Jan;167(1):197-200.
143. Schurich M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 May;144 Suppl 1:S192-8.
144. Sen S, Chaw TE, Ling YS, Xuemei Z, Rajesh H. Effect of recombinant HCG pretreatment on surgical sperm retrieval rates in patients e an audit of our practice. *Fertil Steril* 2020;113:E21e2.
145. Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):601-10. Erratum in: *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1697.
146. Sherman RE, Anderson SA, Dal Pan GJ, Gray GW, Gross T, Hunter NL, et al. Real-World Evidence - What Is It and What Can It Tell Us? *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2293-2297.
147. Shinjo E, Shiraishi K, Matsuyama H. The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology*. 2013 Nov;1(6):929-35.
148. Shiraishi K. Hormonal therapy for non-obstructive azoospermia: basic and clinical perspectives. *Reprod Med Biol*. 2014 Sep 18;14(2):65-72.
149. Shiraishi K, Ishikawa T, Watanabe N, Iwamoto T, Matsuyama H. Salvage hormonal therapy after failed microdissection testicular sperm extraction: A multi-institutional prospective study. *Int J Urol*. 2016 Jun;23(6):496-500.
150. Shiraishi K, Matsuyama H. Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. *Endocr J*. 2017 Feb 27;64(2):123-131.

151. Shiraishi K, Ohmi C, Shimabukuro T, Matsuyama H. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2012 Feb;27(2):331-9.
152. Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Testicular Testosterone and Estradiol Concentrations and Aromatase Expression in Men with Nonobstructive Azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Mar 25;106(4):e1803-e1815.
153. Siadati S, Shafi H, Ghorbani H. Testicular Biopsy in Males With Infertility: A Longitudinal Study. *Iran J Pathol.* 2017 Spring;12(2):177-182.
154. Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl.* 1996 Jul-Aug;17(4):382-93.
155. Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology.* 1995 Dec;136(12):5311-21.
156. Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2278-84.
157. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl.* 2004 Aug;27(4):240-9.
158. Stevens GA, Alkema L, Black RE, Boerma JT, Collins GS, Ezzati M, Grove JT, Hogan DR, Hogan MC, Horton R, Lawn JE, Marušić A, Mathers CD, Murray CJ, Rudan I, Salomon JA, Simpson PJ, Vos T, Welch V; (The GATHER Working Group). Guidelines for Accurate and Transparent Health Estimates Reporting: the GATHER statement. *Lancet.* 2016 Dec 10;388(10062):e19-e23.
159. Stocking K, Wilkinson J, Lensen S, Brison DR, Roberts SA, Vail A. Are interventions in reproductive medicine assessed for plausible and clinically relevant effects? A systematic review of power and precision in trials and meta-analyses. *Hum Reprod.* 2019 Apr 1;34(4):659-665.
160. Sussman EM, Chudnovsky A, Niederberger CS. Hormonal evaluation of the infertile male: has it evolved? *Urol Clin North Am.* 2008 May;35(2):147-55, vii.
161. Tada Y, Hayashi T, Iwaki Y, Karita M, Taguchi S, Funabiki M, et al. Transient azoospermia following rosuvastatin medication for hypercholesterolemia. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2015;42(4):545-6.

162. Tang D, Li K, Geng H, Xu C, Lv M, Gao Y, et al. Identification of deleterious variants in patients with male infertility due to idiopathic non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Apr 2;20(1):63. Erratum in: *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 May 20;20(1):79.
163. Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *J Royal Stat Soc*. (1996) 58:267–88.
164. Tharakan T, Corona G, Foran D, Salonia A, Sofikitis N, Giwercman A, et al. Does hormonal therapy improve sperm retrieval rates in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2022 Aug 25;28(5):609-628.
165. Tharakan T, Salonia A, Corona G, Dhillon W, Minhas S, Jayasena C. The Role of Hormone Stimulation in Men With Nonobstructive Azoospermia Undergoing Surgical Sperm Retrieval. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Dec 1;105(12):dgaa556.
166. Themmen AP, Blok LJ, Post M, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Parmentier M, et al. Follitropin receptor down-regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Jul;78(3):R7-13.
167. Toocheck C, Clister T, Shupe J, Crum C, Ravindranathan P, Lee TK, et al. Mouse Spermatogenesis Requires Classical and Nonclassical Testosterone Signaling. *Biol Reprod*. 2016 Jan;94(1):11.
168. Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M; STROBE Initiative. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2007 Oct 16;4(10):e297.
169. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3666-72.
170. Verza S, Esteves SC. PESA/MESA/TESE/TESE Sperm Processing. In: Nagy Z, Varghese A, Agarwal A, editors. *In Vitro Fertilization*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p.313-34.
171. Vieira JGH, Nakamura OH, Ferrer CM, Tachibana TT, Endo MHK, Carvalho VM. Importância da metodologia na dosagem de testosterona sérica: comparação entre um imunoensaio direto e um método fundamentado em

- cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa em tandem (HPLC/MS-MS). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008Aug;52(6):1050–5. Portuguese.
172. Wang R, Chen ZJ, Vuong LN, Legro RS, Mol BW, Wilkinson J. Large randomized controlled trials in infertility. *Fertil Steril.* 2020 Jun;113(6):1093-1099.
 173. Weedin JW, Khera M, Lipshultz LI. Varicocele repair in patients with nonobstructive azoospermia: a meta-analysis. *J Urol.* 2010 Jun;183(6):2309-15.
 174. WHO, WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, in 5th ed. 2010.
 175. Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PT, Sharpe RM, et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14168.
 176. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int.* 1982 Jul-Aug;20(1):9-10.
 177. Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT; EMAS Group. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med.* 2010 Jul 8;363(2):123-35.
 178. Young J, Xu C, Papadakis GE, Acierno JS, Maione L, Hietamäki J, et al. Clinical Management of Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Rev.* 2019 Apr 1;40(2):669-710.
 179. Zhang S, Li W, Zhu C, Wang X, Li Z, Zhang J, et al. Sertoli cell-specific expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) is required for transcriptional regulation of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene during spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40471-83.
 180. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):92-98.
 181. Zylbersztejn DS, Esteves SC. Varicocele. In: Parekattil SJ, Esteves SC, Agarwal A, editors. *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches*,

Andrology, ART and Antioxidants. Cham: Springer International Publishing; 2020: p.391-407.

182. Zou H. The adaptive Lasso and its oracle properties. J Am Stat Assoc. 2006 Feb;101:1418-29.

8. APÊNDICES

Apêndice 1.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MODULAÇÃO HORMONAL PARA O TRATAMENTO DE HOMENS INFÉRTEIS PORTADORES DE AZOOSPERMIA NÃO-OBSTRUTIVA

Pesquisador Responsável: Dr. Sandro Cassiano Esteves

CRM-SP: 69977

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

E-mail: s.esteves@androfert.com.br

Endereço: ANDROFERT – Clínica de Andrologia e Reprodução Humana

Av. Dr. Heitor Penteado, 1464 – CEP: 13075-460 – Campinas/SP

Telefone: (19) 3295-8877

Número do CAAE: 23217119.9.0000.5404

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante/responsável legal, sendo que uma via deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

A infertilidade conjugal afeta cerca de 10-15% dos casais em idade reprodutiva. Dentre as causas, problemas masculinos, isolados ou associados à problemas femininos, contribuem com cerca de 50% das causas. A azoospermia, definida pela ausência completa de espermatozoides na ejaculação, afeta cerca de 5-10% dos homens com dificuldades para engravidar suas parceiras. A ausência de espermatozoides na ejaculação pode ter caráter obstrutivo (azoospermia obstrutiva), por exemplo, causada por doenças que obstruem os dutos que transportam os espermatozoides após sua formação nos testículos, ou não-obstrutiva (azoospermia não-obstrutiva), quando a ausência de espermatozoides é decorrente da falta de produção por doenças testiculares.

A azoospermia não-obstrutiva é a forma mais grave de infertilidade masculina, não havendo, atualmente, tratamentos capazes de reverter o quadro. Cerca de 50% dos pacientes com azoospermia não-obstrutiva apresentam níveis baixos de testosterona circulante, sendo classificados como hipogonádicos, nome utilizado para definir que o funcionamento da gônada (testículo) é deficiente. A testosterona é crucial para que haja produção de espermatozoides. Níveis diminuídos de testosterona no interior do testículo afeta o amadurecimento dos gametas e a produção como um todo.

A hipótese deste estudo é que a otimização dos níveis de testosterona no sangue com uso de medicamentos (chamada modulação hormonal) possa favorecer a produção de espermatozoides pelo testículo e, conseqüentemente, aumentar as chances de i. Aparecimento de espermatozoides na ejaculação ou ii. Sucesso nos procedimentos cirúrgicos para extração de espermatozoides do testículo com a finalidade de utilizá-los para fertilizar os óvulos no laboratório (in vitro).

Dessa forma, os objetivos deste estudo são:

- Avaliar os efeitos da modulação hormonal com uso de medicamentos nos homens inférteis com diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva em relação ao sucesso no aparecimento de espermatozoides na ejaculação e na obtenção de espermatozoides viáveis por meio da extração cirúrgica.
- Avaliar os fatores que influenciam, o sucesso da modulação hormonal, incluindo as taxas de testosterona obtidas ao final do tratamento, duração do tratamento, tipo de medicamentos utilizados. Assim, será possível caracterizar melhor o grupo de homens com azoospermia não-obstrutiva que possam se beneficiar da modulação hormonal.

Procedimentos:

Você está sendo convidado a participar deste estudo e permitir a análise de dados do seu prontuário médico por ser um dos pacientes com diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva tratados na ANDROFERT. Serão analisados dados da consulta médica como histórico de doenças e tratamentos realizados, tempo de infertilidade, exame físico, e análise de exames laboratoriais. Por ser um estudo que se baseia apenas em análise de dados de prontuário, não será necessário o deslocamento dos pacientes ao serviço de origem, isto é, para a ANDROFERT. Ademais, o pesquisado não será submetido a nenhuma entrevista ou questionário adicional. Serão utilizadas apenas as informações já contidas nos prontuários de cada paciente. Trata-se de um estudo retrospectivo (relativo a fatos passados) de análise de dados dos prontuários médicos.

Não haverá necessidade de coletar novas amostras de sangue ou qualquer outro exame do pesquisado, sendo apenas analisado os resultados de exames já coletados e cujos resultados já foram anotados em prontuário. Será garantido o anonimato dos participantes.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo caso não deseje que dados de seu prontuário sejam analisados pelo pesquisador.

Neste estudo há um risco mínimo de dano psicológico e emocional relacionados ao fato do pesquisador analisar o prontuário do paciente. Porém, apenas o pesquisador terá acesso a esses dados e o sigilo será garantido para que nenhuma outra pessoa que não pesquisador tenha acesso as informações particulares do paciente. A fim de minimizar os riscos e desconfortos do pesquisado, o pesquisador fará a análise dos prontuários na própria clínica ANDROFERT onde já ficam armazenados estes prontuários. Todos os dados serão coletados e armazenados com

acesso apenas do pesquisador e mantendo codificado os dados a fim de manter ao máximo o sigilo do paciente.

Benefícios:

O conhecimento adquirido com este estudo pode beneficiar, no futuro, homens como você. Especificamente, os resultados obtidos por meio deste estudo poderão ajudar os médicos a aconselhar seus pacientes com azoospermia não-obstrutiva sobre suas chances de obter espermatozoides com o uso de medicamentos. Os profissionais de saúde terão conhecimento sobre o melhor esquema de modulação hormonal com a finalidade de otimizar as chances de obter espermatozoides. Porém, não haverá benefícios diretos para os pacientes participantes deste estudo.

Acompanhamento e assistência:

Você tem o direito à assistência integral e gratuita devido a danos diretos e indiretos, imediatos e tardios, pelo tempo que for necessário. Será dado acompanhamento ao participante da pesquisa mesmo após encerrado o estudo avaliando a saúde e evolução do tratamento que o pesquisado foi submetido. O participante tem o direito ao acesso dos resultados da pesquisa, exames e do tratamento sempre que solicitado. O paciente pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que desejar e, assim, seus dados não serão coletados ou então retirados para análise final.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Este estudo é constituído de análise de dados de prontuário e todas as informações obtidas serão codificadas a fim de manter em anonimato os pacientes participantes da pesquisa e apenas os pesquisadores terão acesso a tais dados.

Ressarcimento e Indenização:

Este estudo será elaborado apenas com análise de dados de prontuário e não há necessidade de deslocamento de paciente ou despesas previstas por parte dos pacientes participantes. Caso haja qualquer despesa financeira por parte do pesquisado, esta será ressarcida integralmente conforme apresentado seus gastos como transporte, alimentação, diárias ou qualquer outro tipo de gasto que possam ocorrer para a realização deste estudo. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores:

- Sandro Cassiano Esteves
E-mail: s.esteves@androfert.com.br

Endereço: ANDROFERT – Clínica de Andrologia e Reprodução Humana
Av. Dr. Heitor Penteado, 1464 – CEP: 13075-460 – Campinas/SP
Telefone: (19) 3295-8877

- Arnold Peter Paul Achermann
E-mail: arnoldpp@gmail.com
Endereço: Rua Rua Vital Brasil, 250 – CEP: 13083-590 – Campinas/SP
Telefone: (19) 3295-8877
- Cássio Luís Zanettini Riccetto
E-mail: cassioriccetto@gmail.com
Endereço: Rua Rua Vital Brasil, 250 – CEP: 13083-590 – Campinas/SP
Telefone: (19) 3295-8877

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:00hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:30hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@unicamp.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante da pesquisa:

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante da pesquisa ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante da pesquisa. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante da pesquisa.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

9. ANEXOS

Anexo 1. Texto base sobre Azoospermia, espermatogênese, recuperação espermática e estimulação hormonal.

Azoospermia (a-, sem + -zoo- [do grego zôion, animal] + -spermia- [do grego sperma, esperma/semente]) é definida pela ausência de espermatozoides no ejaculado. O termo descreve a ausência de espermatozoides na análise seminal, não implicando nenhum fator etiológico. Estimativas globais indicam que aproximadamente 1% de toda população masculina e próximo de 10% dos homens inférteis sofrem com essa condição [Willott, 1982; Jarow et al., 1989].

A presença de azoospermia deve ser confirmada por meio da centrifugação do ejaculado e análise microscópica do sedimento, a fim de excluir a existência de raros espermatozoides não evidenciados na análise inicial, condição esta conhecida como criptozoospermia [Cooper et al., 2006; Cocuzza et al., 2013; Miller et al., 2017]. Além disso, o diagnóstico de azoospermia deve ser confirmado em uma ou mais análises seminais, uma vez que há a possibilidade de ocorrer azoospermia transitória causada por doenças febris/infecciosas, exposição a agentes tóxicos ou térmicos, ou erros durante a coleta ou análise seminal [Castilla et al., 2006; Kumar, 2013; Cocuzza et al., 2013; Tada et al., 2015; Esteves, 2015a]. A análise seminal em múltiplas ocasiões para investigação de azoospermia também é importante diante da oscilação na produção de espermatozoides em um mesmo indivíduo inerente à variabilidade biológica intrínseca [Castilla et al., 2006; Keel, 2006].

Diagnóstico Diferencial de Azoospermia

Em geral, a azoospermia é classificada em duas categorias: azoospermia obstrutiva (AO) e azoospermia não-obstrutiva (ANO) [Cocuzza et al., 2013; Esteves et al., 2013a]. A avaliação histopatológica de biópsias testiculares de homens com AO demonstra a presença de espermatogênese completa, enquanto biópsias obtidas de homens com ANO revelam túbulos seminíferos hialinizados, aplasia de células germinativas (somente células de Sertoli, do inglês *Sertoli cell-only* [SCO]), parada de maturação germinativa, ou hipoespermatogênese. O padrão histológico é geralmente do tipo puro nos pacientes com AO [Siadati et al., 2017], enquanto aqueles com ANO apresentam padrão histológico puro ou misto [Abdullah & Bondagji, 2011; Siadati et al., 2017; Punjani et al., 2021b].

Embora a biópsia testicular seguida de avaliação histológica seja o padrão ouro para definir o tipo de azoospermia [Dohle et al., 2012; Schlegel et al., 2021], do ponto de vista prático, tal diferenciação pode ser feita na maioria dos casos por meio da avaliação andrológica detalhada, incluindo anamnese, exame físico, análise seminal, perfil hormonal, somada a estudo genético e de imagem [Esteves et al., 2011a; Andrade et al., 2021]. Juntos, esses parâmetros apresentam uma acurácia superior a 90% para determinar se a azoospermia é obstrutiva ou não-obstrutiva [Schlegel, 2004; Esteves, 2015a]. Entretanto, existem casos duvidosos nos quais a diferenciação diagnóstica entre AO e ANO somente é obtida pela biópsia testicular, seguida da análise histopatológica da amostra.

A determinação do tipo de azoospermia é crucial, uma vez que impacta tanto o prognóstico de fertilidade quanto o manejo clínico. Nos casos de AO, a espermatogênese é normal e a azoospermia resulta de uma obstrução mecânica presente em algum ponto ao longo do trato reprodutivo (ex. epidídimo, ducto deferente ou ducto ejaculatório) [Esteves et al., 2013a; Lopes et al., 2020]. A AO pode ser tratada por meio de procedimentos reconstrutivos ou manejada por meio de recuperação espermática e injeção intracitoplasmática do espermatozoide (do inglês ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) [Hayden et al., 2015; Miyaoka et al., 2019; Achermann et al., 2021a].

Por outro lado, a ANO está associada à falência espermatogênica causada por alterações testiculares primárias ou níveis endógenos inadequados de gonadotrofinas hipofisárias [Cocuzza et al., 2013; Esteves et al., 2013a]. É fundamental estabelecer se a ANO advém desta última, condição conhecida como hipogonadismo hipogonadotrófico e caracterizada pela azoospermia, diminuição do volume testicular e baixos níveis séricos de testosterona, decorrentes da falta de estimulação testicular pelos hormônios folículo-estimulante (do inglês FSH, *follicle-stimulating hormone*) e luteinizante (do inglês LH, *luteinizing hormone*). O hipogonadismo hipogonadotrófico tem como causa defeitos congênitos (ex. síndrome de Kallmann), desordens adquiridas como tumores da hipófise ou cirurgias, ou condições iatrogênicas (por exemplo, terapia de reposição de testosterona) [Kumar, 2013; Fraietta et al., 2013; Ohlander et al., 2016; Young et al., 2019; Salonia et al., 2019]. Embora raro, o hipogonadismo hipogonadotrófico é tratável, e, independentemente da sua causa, responde muito bem à farmacoterapia com a administração de gonadotrofina exógena (por exemplo, gonadotrofina coriônica humana [hCG, do inglês *human chorionic gonadotropin*] associada ou não ao FSH). O tratamento medicamentoso restabelece a espermatogênese na maioria dos homens afetados, resultando em taxas de gravidez superiores a 65%, seja por

concepção natural ou por meio de reprodução assistida [Ohlander et al., 2016; Young et al., 2019].

Por outro lado, as alterações testiculares primárias que levam à falência espermatogênica são intratáveis, representando aproximadamente dois terços de todos os casos de azoospermia e a maioria dos casos de ANO [Cocuzza et al., 2013; Esteves, 2015a; Caroppo et al., 2021]. Dentre as alterações testiculares intrínsecas associadas à falência espermatogênica, destacam-se as anormalidades congênitas e genéticas (por exemplo, criptorquidia, síndrome de Klinefelter, microdeleções do cromossomo Y), doenças adquiridas (por exemplo, orquite e trauma testicular), exposição a agentes gonadotóxicos (por exemplo, radioterapia e quimioterapia). Porém, em muitas situações, o fator etiológico não pode ser estabelecido e, nesses casos, a ANO é denominada idiopática [Esteves, 2015a; Chiba et al., 2016].

Recuperação Espermática na Azoospermia Não-Obstrutiva

Apesar de ser reconhecida como a apresentação clínica mais grave da infertilidade masculina, devido à sua natureza irreversível e intratável, a ANO por falência espermatogênica não significa necessariamente esterilidade. A razão é que 30 a 60% dos homens afetados apresentam áreas focais de espermatogênese ativa nos espécimes de biópsia testicular [Silber, 2000; Esteves, 2015a]. Consequentemente, espermatozoides podem ser obtidos cirurgicamente do testículo e usados para fertilização assistida por meio da técnica de ICSI [Shiraishi, 2014; Esteves et al., 2020b]. Está bem estabelecido que os espermatozoides testiculares são capazes de fertilizar os oócitos e promover desenvolvimento embrionário, resultando em prole saudável via ICSI [Esteves et al., 2018; Rumbold et al., 2019; Lopes et al., 2020].

As principais técnicas cirúrgicas para recuperação de espermatozoides de homens com ANO incluem a aspiração percutânea de espermatozoides do testículo (do inglês TESA, *testicular sperm aspiration*), biópsia testicular aberta única ou múltipla não-microcirúrgica (do inglês TESE, *testicular sperm extraction*) e biópsia testicular aberta microcirúrgica (do inglês micro-TESE, *microdissection testicular sperm extraction*) [Silber, 2000; Esteves et al., 2011b; Miyaoka et al., 2019; Esteves et al., 2020]. Por meio dessas técnicas realizadas em pacientes com ANO, as taxas de recuperação de espermatozoides reportadas variam de 20% a 63% [Esteves et al., 2011b; Miyaoka et al., 2019; Schlegel, 1999; Arshad et al., 2020; Achermann et al., 2021b]. A probabilidade de sucesso na obtenção de espermatozoides testiculares depende primariamente das características histológicas do testículo e da técnica utilizada para a

recuperação espermática. As taxas de sucesso são maiores nos indivíduos cuja histologia testicular apresenta áreas de hipoespermatogênese ou parada de maturação germinativa, quando comparadas aos testículos com aplasia germinativa [Miyaoka et al., 2019; Achermann et al., 2021b]. Além disso, as taxas de recuperação de espermatozoides são maiores com métodos abertos do que com métodos percutâneos. Dados de estudos controlados indicam que a probabilidade de sucesso na recuperação de espermatozoides é 1,3-2,0 vezes maior com a técnica microcirúrgica (micro-TESE) do que com a técnica não-microcirúrgica (TESE convencional) [Bernie et al., 2015; Esteves et al., 2020b; Achermann et al., 2021b]. Apesar de uma abordagem mais invasiva e de tempo cirúrgico mais longo, a micro-TESE permite uma exposição de todo o parênquima testicular, ampliação de visão do campo operatório por meio do microscópio e identificação dos túbulos seminíferos por todo o testículo, assim como sua vascularização. Dessa forma, menor quantidade de parênquima testicular é extraída, pois a extração é dirigida aos túbulos seminíferos mais largos presentes na superfície ou profundamente nos lobos testiculares. Soma-se ao fato de gerar menores complicações como hematomas e comprometimento dos níveis de testosterona por evitar lesões vasculares sob visão direta e retirar menos tecidos com células de Leydig quando comparado ao procedimento de TESE convencional. A eficácia da técnica da micro-TESE é alcançada por meio da expertise do cirurgião, aliada a um laboratório apto a analisar as amostras com elevado padrão técnico [Miyaoka et al., 2019; Achermann et al., 2021b; Punjani et al., 2021a].

Estimulação da Espermatogênese na Azoospermia Não-Obstrutiva

Atualmente, a recuperação cirúrgica de espermatozoides testiculares, combinada à técnica de ICSI, consiste na única opção para homens com ANO –causada por alterações testiculares primárias– gerar filhos biológicos. Porém, as taxas de sucesso na recuperação de espermatozoides testiculares permanecem insatisfatórias [Shiraishi et al., 2016; Punjani et al., 2021a] e, portanto, para esses pacientes, seria ideal otimizar a espermatogênese para aumentar as chances de êxito na recuperação espermática. Entretanto, o conceito prevalente é de que a farmacoterapia é ineficaz na estimulação da espermatogênese desses indivíduos, pois os níveis plasmáticos de gonadotrofinas hipofisárias encontram-se normais ou elevados e, portanto, os testículos já estão adequadamente estimulados. Apesar disso, publicações recentes sugerem que a estimulação hormonal com moduladores seletivos de receptores de estrogênio ou gonadotrofinas exógenas poderiam aumentar a espermatogênese em homens com ANO [Shiraishi et al., 2012; Shinjo et al., 2013; Kato et al., 2014; Laursen et al., 2019]. A razão pela

qual estimulação hormonal parece oferecer benefício para os pacientes com ANO normogonadotróficos (níveis séricos normais de FSH e LH) ou hipergonadotróficos (níveis séricos elevados de FSH e LH) não está bem estabelecida, mas especula-se que esteja relacionada ao papel crucial desempenhado pela testosterona intratesticular (TIT) na espermatogênese, como discutido a seguir.

Azoospermia Não-Obstrutiva e Eixo Hormonal

Homens com ANO, causada por alterações testiculares primárias, frequentemente apresentam sinais de hipogonadismo, particularmente a presença de baixos níveis de testosterona e testículos de tamanho reduzido (<15 ml ou <4,6 cm no seu maior eixo) [Schoor et al., 2002; Andrade et al., 2021]. Aproximadamente metade desses pacientes tem níveis séricos de testosterona total (TT) abaixo de 300 ng/dL, refletindo assim uma insuficiência concomitante das células de Leydig, causada pela diminuição quantitativa ou qualitativa da atividade celular [Sussman et al., 2008; Reifsnnyder et al., 2012; Salonia et al., 2019].

Além disso, níveis endógenos de FSH superiores a 7,6 UI/L são encontrados em cerca de 90% dos homens com ANO [Schoor et al., 2002; Gudeloglu et al., 2013]. Os níveis de FSH correlacionam-se negativamente com o número de espermatogônias. Quando as espermatogônias estão ausentes ou marcadamente reduzidas em quantidade, o nível de FSH aumenta; quando o número de espermatogônias é normal, mas existe parada de maturação na fase de espermatócito ou de espermátide, o nível de FSH geralmente está dentro da faixa normal [Huhtaniemi, 2015; Oduwole et al., 2018]. Embora os níveis elevados de FSH combinados com níveis séricos de testosterona total diminuídos sejam indicativos de deficiência testicular primária e, portanto, informativos para estabelecer o diagnóstico clínico de ANO, esses achados refletem apenas o estado global da função espermatogênica e não podem ser usados para prever o sucesso da recuperação espermática [Hussein et al., 2013; Shiraishi et al., 2017; Arshad et al., 2020; Caroppo et al., 2021].

Em humanos, a espermatogênese é estimulada pela ação sinérgica de FSH e de testosterona endógenas. Sua duração, desde o início até o aparecimento de espermatozoides na ejaculação, é estimada em 64 dias (+/- 8 dias) [Misell et al., 2006]. A secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (do inglês GnRH, *gonadotrophin-releasing hormone*) pelo hipotálamo estimula a biossíntese de LH e FSH pela hipófise [Oduwole et al., 2018]. O LH promove a síntese e a secreção de testosterona localmente no testículo pela estimulação das células de Leydig. Por outro lado, o FSH desempenha um papel essencial nos primeiros estágios

da espermatogênese (fase dependente de FSH), estimulando a progressão meiótica das espermatogônias até o estágio de espermátides no interior dos túbulos seminíferos, por sua ação no metabolismo e transporte de substâncias nutritivas das células de Sertoli para as células germinativas [Shiraishi et al., 2017; Salonia et al., 2019]. Além disso, o FSH modula o número de células de Sertoli e a proliferação das espermatogônias [Oduwale et al., 2018]. A testosterona, por sua vez, atua via seus receptores (Receptor Androgênico; RA), presentes no interior das células de Sertoli, resultando na secreção de estímulos parácrinos para as células germinativas. A expressão de RAs nas células de Sertoli na puberdade é essencial para o início da espermatogênese [Larose et al., 2020].

Espermatogênese e Testosterona Intratesticular

Nos homens adultos, a estimulação adequada das células de Sertoli pela testosterona é necessária para a espermatogênese normal. A progressão pós-meioótica de espermátides redondas para espermatozoides maduros (espermio gênese) é intrinsecamente dependente dos níveis fisiológicos de TIT [Shiraishi et al., 2017; Oduwale et al., 2018]. Embora haja correlação entre os níveis de TIT e circulantes, os primeiros são 50-100 vezes mais altos que os últimos [Coviello et al., 2005; Ohlander et al., 2016]. A hipótese de que homens com ANO e hipogonadismo normogonadotrófico ou hipergonadotrófico podem não ter níveis adequados de TIT, devido às alterações intrínsecas testiculares, tem sido levantada por alguns autores [Foresta et al., 2004; Fink et al., 2021]. Tais autores postulam que a estimulação da produção de TIT, com auxílio de medicamentos específicos, teria efeito benéfico, devido ao papel crucial que essa molécula desempenha na espermatogênese, combinada à estimulação das células de Sertoli por níveis fisiológicos de FSH.

Além disso, é sabido que a ação das gonadotrofinas hipofisárias é determinada pela frequência, amplitude e duração da secreção pulsátil [Levalle et al., 1994; Shiraishi et al., 2012; Shiraishi et al., 2017]. Nos pacientes com ANO exibindo níveis basais mais elevados de gonadotrofinas endógenas, as amplitudes relativas do FSH e LH se reduzem, levando a uma estimulação paradoxalmente mais fraca das células de Leydig e Sertoli [Levalle et al., 1994; Sussman et al., 2008; Shiraishi et al., 2012; Shiraishi et al., 2017; Santi et al., 2020]. Além disso, evidências obtidas de estudos animais e humanos indicam que níveis circulantes excessivos de FSH, como aqueles observados nos pacientes com ANO e hipogonadismo hipergonadotrófico, podem induzir a regulação negativa dos receptores de FSH na célula de Sertoli [Gnanaprakasam et al., 1979; Namiki et al., 1985; Namiki et al., 1987; Themmen et al.,

1991; Foresta et al., 2004; Zhang et al., 2012]. Como resultado, as células de Sertoli não são estimuladas adequadamente, apesar da existência de níveis séricos de FSH adequados.

Com base nas considerações acima, especula-se que a estimulação hormonal possa ter utilidade clínica para homens com ANO e hipogonadismo normogonadotrófico ou hipergonadotrófico, visando principalmente aumentar a produção de TIT [Reifsnnyder et al., 2012; Esteves, 2015a]. Moduladores seletivos de receptores de estrogênio, inibidores de aromatase, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e FSH têm sido usados de forma *off-label*, ou seja, fora das diretrizes das indicações homologadas para o fármaco em bula, para modular os hormônios reprodutivos masculinos, otimizando a produção de TIT e, conseqüentemente, a espermatogênese, tendo como objetivo final aumentar as taxas de sucesso da recuperação cirúrgica de espermatozoides [Gregoriou et al., 2012; Shiraishi et al., 2016; Klami et al., 2018; Cannarella et al., 2019]. Séries de casos e alguns estudos de coorte sugerem que tais tratamentos estimulam a produção espermática, levando ao aumento das taxas de recuperação cirúrgica de espermatozoides e, em alguns casos, possibilitando o aparecimento de espermatozoides no ejaculado [Shiraishi, 2014; Laursen et al., 2019; Tharakan et al., 2020; Andrade et al., 2021].

Anexo 2. Características dos imunoensaios utilizados para mensuração dos níveis hormonais no presente estudo.

Hormônios	Método	Valores de Referência	Limite inferior para detecção*	Variabilidade intraensaio*	Variabilidade interensaio*
FSH	ECLIA	1,5-10,0 UI/L	0,1 UI/L	≤2,8%	≤4,5%
LH	ECLIA	1,7-9,0 UI/L	0,1 UI/L	≤2,0%	≤2,0%
Estradiol	ECLIA	11,3-43,2 pg/mL	5 pg/mL	≤6,7%	≤10,6%
Prolactina	ECLIA	2,1-24,0 ng/mL	0,5 ng/mL	≤4,8%	≤4,0%
Total Testosterona	ECLIA	240,0-816,0 ng/dL	2,5 ng/dL	≤3,5%	≤9,3%
Testosterona Livre	Calculado ¹	4,7-25,0 ng/dL	-	-	-
SHBG	ECLIA	18,0-54,0 nmol/L [¶]	0,35 nmol/L	≤5,6%	≤6,0%
TSH	ECLIA	0,45-4,5 mUI/L	0,05 mUI/L	≤8,6%	≤5,0%
T4 Livre	ECLIA	0,90-1,70 ng/dL	0,04 ng/dL	≤5,7%	≤3,6%

ECLIA: do inglês análise de imunoensaio por eletroquimioiluminescência (Cobas e, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

*Dados do fabricante. Disponível por meio de: Roche Product care Immunology <http://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/>; Acessado no dia 24 de Janeiro de 2022.

¹Calculation based on the method of Vermeulen et al., J. Clin. Endocrinol Metab 84: 3666-72, 1999.

[¶]18-54 anos de idade

FSH: Hormônio folículo estimulante; LH: Hormônio luteinizante; SHBG: globulina de ligação a esteroides sexuais; TSH: hormônio estimulante da tireoide, T4: tiroxina

Anexo 3. Limiar das concentrações séricas de testosterona total conforme recomendado por diferentes sociedades médicas profissionais para definição de hipogonadismo bioquímico.

Sociedades	Testosterona Total	
	nmol/L	ng/dL
American Urological Association (Mulhall et al., 2018)	10,4	300
British Society Sexual Medicine (Hackett et al., 2017)	12	346
Canadian Medical Association (Morales et al., 2015)	Variação laboratorial local	----
Endocrine Society (Bhasin et al., 2018)	9,2	264
Endocrine Society of Australia (Yeap et al., 2016)	7,4 (jovens); 6,6 (homens com mais de 60 anos)	216 / 190
European Academy of Andrology (Corona et al., 2020)	12	350
European Association of Urology (Salonia et al., 2021)	12	350
International Consultation for Sexual Medicine (Morgentaler et al., 2019)	12,1	350
International Society for the Study of the Aging Male (Lunenfeld et al., 2015)	12	350

Anexo 4. Link para acessar bula do medicamento Ovidrel® (alfacoriogonadotropina) para o profissional de saúde.

https://www.merckgroup.com/br-pt/bulario/Ovidrel_Bula_Profissional_260321.pdf

Anexo 5. Link para acessar bula do medicamento Gonal-f® (alfafolitropina) para o profissional de saúde.

<https://4bio.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Gonal-646-647-649-1.pdf>

Anexo 6. Número de pacientes elegíveis (N), participantes com dados faltantes de acordo com cada variável (N faltante), e % de participantes faltantes por variáveis.

Variável	N	N Faltante	% Faltante
Idade	616	0	0%
Índice de Massa Corpórea	616	0	0%
Duração de Infertilidade	616	0	0%
Lateralidade da Micro-TESE	616	0	0%
Histologia (predominante)	616	0	0%
Histologia (avançado)	616	0	0%
Tecido extraído	616	0	0%
FSH Basal	616	0	0%
FSH Pre-Micro-TESE	616	0	0%
LH Basal	616	0	0%
LH Pre-MicroTESE	616	0	0%
E2 Basal	616	0	0%
E2 Pre-Micro-TESE	616	0	0%
Testosterona Livre Basal	616	0	0%
Testosterona Livre Pre-Micro-TESE	616	0	0%
Relação TT/E2 Basal	616	0	0%
Relação TT/E2 Pre-Micro-TESE	616	0	0%
Volume Testicular	616	0	0%
Etiologia	616	0	0%
Varicocele Clínica	616	0	0%
Varicocelectomia Prévia	616	0	0%
Tratamento com Gonadotrofina	291	0	0%
Adição de Inibidor de Aromatase	291	0	0%
Dose Acumulada de hCG	291	0	0%
Dose Acumulada de rec-FSH	291	0	0%
Duração do Tratamento	291	0	0%

E2: estradiol; FSH: hormônio folículo-estimulante; LH: hormônio luteinizante; micro-TESE: extração de espermatozoides testiculares por microdissecção; rec-FSH: hormônio folículo estimulante recombinante; SHBG: globulina ligadora de hormônio sexual; TT: testosterona total.

Anexo 7. Fórmula utilizada para calcular o número de pacientes necessário para tratar (NNT) com ou sem estimulação hormonal prévio a recuperação espermática.

Fórmula para Calcular o Número Necessário para Tratar (NNT):

Redução de Risco Absoluto (RRA)

Grupo Tratado (GT)

Grupo Controle (GC)

Recuperação Espermática (RE)

$$RRA = \frac{\text{GT com RE Positivo}}{\text{GT com RE Positivo} + \text{GT com RE Negativo}} - \frac{\text{GC com RE Positivo}}{\text{GC com RE Positivo} + \text{GC com RE Negativo}}$$

$$NNT = \frac{1}{RRA}$$

Anexo 8. Principais comentários dos professores da banca de Qualificação (26/03/2024), respostas e alterações realizadas.

Prof. Dr. Daniel Suslik Zylbersztejn

Comentário	Resposta	Alterações realizadas	
		Página	Linha
Micro-TESE só apresenta bons resultados se executada por cirurgião experiente	Adicionado informação no texto	119	3614
Adicionar informação do tempo de meia-vida de LH e hCG	Adicionado informação no texto	20	559
Estudo observacional prospectivo ou retrospectivo?	Estudo retrospectivo – corrigido no texto	22	609
Uso de gonadotrofinas eram recombinantes – quais? Adicionar nos objetivos	Adicionado informação no texto	23	638
Critérios de inclusão e de exclusão mais claros, quanto a hipogonadismo, exclusão de pacientes eugonádicos, níveis de FSH.	Adicionado informações no texto a fim de esclarecer critérios de inclusão e exclusão do estudo de forma mais clara	24 e 25	687 e 703
Exame físico foi realizado por qual ou quais profissionais? Tinham experiência na avaliação de varicocele?	Adicionado informação no texto	26	741

Prof. Dr. Ricardo Destro Saade

Comentário	Resposta	Alterações realizadas	
		Página	Linha
Correção de abreviaturas	Corrigido	13	371
Por que foi escolhido níveis de testosterona mínimos para definição hipogonadismo bioquímico quando inferior a 350 ng/dL?	Adicionado informação no texto	28	799
Critérios de inclusão e de exclusão mais claros, quanto a hipogonadismo, exclusão de pacientes eugonádicos, níveis de FSH.	Adicionado informações no texto a fim de esclarecer critérios de inclusão e exclusão do estudo	24 e 25	687 e 703
Exame físico foi realizado por qual ou quais profissionais? Tinham experiência na avaliação de varicocele?	Adicionado informação no texto	26	741
Por que se avaliou níveis de testosterona livre?	Adicionado informação no texto	27	792
Por que foi realizado USTR e não RNM nos casos de suspeita de obstrução do ducto ejaculatório?	Adicionado informação no texto	29	849
Por que foi oferecido hCG recombinante e não urinário?	Adicionado informação no texto	31	913
Quando não atingido os níveis ideais de testosterona, tidos como “alvo” entre 500-900 ng/dL, o que foi feito? Prolongou tempo de estimulação hormonal?	Adicionado informação no texto	34	1019
Quantos casos necessitaram de biópsia pré-micro-TESE para diagnosticar ANO?	Adicionado informação no texto	61	1649

Prof. Dr. Sandro Cassiano Esteves

Comentário	Resposta	Alterações realizadas	
		Página	Linha
Adicionar tabela demonstrando limiares de testosterona para definição de hipogonadismo bioquímico entre as diversas sociedades médicas	Adicionado tabela em anexo (Anexo 3)	123	3731