

Andrología

Crioconservación de semen en pacientes oncológicos: 17 años de experiencia

Cryopreservation of semen in cancer patients: 17 years' experience.

Mendoza J.L, Castilla J.A, Martínez L, Magán R, García-Peña M.L, Ortiz A, González E, Fontes J, Maldonado V, Mendoza N, Ortiz de Galisteo J.R.

Unidad de Reproducción, H.U. "Virgen de las Nieves", Granada. España.

Resumen

Fundamento: *Analizar nuestra experiencia a lo largo de 17 años en la crioconservación de semen en pacientes oncológicos y los resultados obtenidos al usar dichas muestras de semen con técnicas de reproducción asistida.*

Población y métodos: *Se estudia semen de pacientes oncológicos remitidos a nuestra Unidad para crioconservación de semen y de varones candidatos a prevasectomía que desean conservar semen congelado. Para el estudio de las muestras de semen se siguieron las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud en sus diferentes ediciones 1987, 1992 y 1999. Los parámetros seminales analizados fueron: volumen, pH, concentración y movilidad antes y después de la congelación.*

Resultados: *Entre Febrero de 1986 y Diciembre de 2002, 141 hombres con una edad media de 31 años (16-51 años) fueron remitidos a nuestra Unidad por distintas unidades clínicas para crioconservación de semen. Veinticinco (17,7%) pacientes estaban diagnosticados de linfoma de Hodgkin, 59 (41,8 %) de cáncer testicular, 24 (17,0%) de leucemia o linfoma no Hodgkin, y 33 (23,4%) de otros tipos de cáncer (recto, próstata, pulmón, etc.). En los últimos años se observa un incremento en la demanda de esta técnica, en especial en pacientes con cáncer testicular. Los pacientes con cáncer presentan en general una menor calidad seminal que varones fértiles. Cuatro varones (4,7%) intentaron hacer uso de semen congelado, aunque a uno de ellos no se le pudo aplicar técnicas de reproducción asistida. A los 3 restantes se le aplicó ICSI, uno de ellos realizó dos ciclos y otro un ciclo, todos sin éxito. Un tercero que había recibido quimioterapia previo a la congelación realizó un ciclo, con embarazo y nacimiento de una niña sana.*

Conclusiones: *La crioconservación de semen en pacientes oncológicos unido a su posterior uso con técnicas de reproducción asistida es un método válido para preservar la fertilidad.*

Palabras clave: Semen. Cáncer. Congelación. Reproducción asistida. Microinseminación.

Correspondencia: Dr. José Antonio Castilla
Unidad de Reproducción. Hospital Materno-Infantil
H.U. "Virgen de las Nieves"
Avda. Fuerzas Armadas,2
18014 Granada (España)
josea.castilla.sspa@juntadeandalucia.es

Summary

Objectives: *To analyse our experience over the past 17 year's in the cryoconservation of semen in oncology patients and the results obtained when these semen samples are used with assisted reproduction techniques.*

Population and methods: *We studied semen sent to our Unit for cryoconservation, obtained from oncology patients and from prevasectomy males who wanted to preserve frozen semen. Semen samples were studied following the recommendations of the World Health Organisation (1987, 1992 and 1999). The following semen parameters were analysed: volume, pH, concentration and mobility, both before and after freezing.*

Results: *Between February 1986 and December 2002, 141 men with an average age of 31 years (range 16-51 years) were directed to our Unit by different clinical units for cryoconservation of semen. Of these patients, 25 (17.7%) had been diagnosed with Hodgkin's lymphoma, 59 (41.8%) with testicular cancer, 24 (17.0%) with leukemia or non-Hodgkin's lymphoma, and 33 (23.4%) with other types of cancer (rectum, prostate, lung, etc.). In recent years, there has been an increase in demand for semen cryoconservation, particularly among patients with testicular cancer. In general, cancer patients present lower semen quality than fertile males. Of our study group, 4 men (4.7%) were candidates to make use of frozen semen, although in one case assisted reproduction techniques could not be applied. Of the other 3, microinsemination was unsuccessfully performed in 2 cases. In one of these, 2 attempts were made, and in the other, a single attempt. In the third case, in which chemotherapy had been applied prior to semen cryoconservation, a single, successful attempt was made, resulting in pregnancy and the birth of a healthy baby girl.*

Conclusions: *Semen cryopreservation among oncology patients, for subsequent use with techniques of assisted reproduction, is a valid method for maintaining fertility.*

Key words: Semen. Cancer. Freezing. Assisted reproduction. Microinsemination.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia de pacientes jóvenes con cáncer se ha incrementado en las últimas décadas, debido tanto a las nuevas técnicas diagnósticas como a la incorporación de nuevas armas terapéuticas. Muchos de estos pacientes presenta una baja calidad seminal antes de recibir cualquier tratamiento (1,2) y otros pacientes sufren un grave deterioro de su capacidad reproductiva tras la oncoterapia (3-8). Éste deterioro puede ser transitorio o definitivo, y no puede ser pronosticado con exactitud, dependiendo del tipo de cáncer, tratamiento recibido y calidad seminal previa. Por otra parte, el desarrollo de la reproducción asistida ha sido la herramienta que ha permitido conseguir un gran número de gestaciones con estas muestras de semen crioconservadas.

Todo lo anterior llevó a recomendar a pacientes oncológicos con deseos reproductivos la crioconservación de semen previa a los tratamientos oncológicos. Las primeras congelaciones de semen con este fin se realizaron hace 30 años (9-11). Se obtuvieron

los primeros embarazos con semen crioconservado de pacientes oncológicos mediante inseminación artificial (7) y posteriormente a partir de mediados de los 80 mediante fecundación in vitro (FIV) y técnicas afines como la inseminación intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (5,9,12,13).

En el presente trabajo se pretende analizar nuestra experiencia a lo largo de 17 años en la crioconservación de semen en pacientes oncológicos y los resultados obtenidos al usar dichas muestras de semen con técnicas de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

A todos los pacientes oncológicos remitidos a nuestra Unidad de Reproducción para crioconservación de semen se les solicitó al menos una muestra de semen. Cuando de un paciente se analizaron más eyaculados, se calculó el valor medio para cada parámetro seminal. Todos los pacientes presentaron el día del eyaculado una abstinencia sexual superior a 48 horas. Para la comparación de la calidad seminal de

los pacientes oncológicos con varones fértiles, se analizó durante el periodo que comprende este estudio semen de varones candidatos a vasectomía con deseos de criopreservar semen previo a ésta.

Para el estudio de las muestras de semen se siguieron las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los parámetros seminales analizados fueron: volumen, pH, concentración y movilidad. La morfología se analizó en todos los eyaculados pero dado que los criterios morfológicos empleados han ido cambiando en las diferentes recomendaciones de la OMS, los datos obtenidos a lo largo de los años no pueden compararse.

Las muestras de semen que se consideraron aptas para criopreservación se congelaron según lo descrito anteriormente. Brevemente, el medio de congelación utilizado consistió en una solución acuosa tamponada cuyo crioprotector fue glicerol, otros componentes de dicha solución crioprotectora son yema de huevo, glucosa, glicocola, citrato sódico, penicilina y estreptomomicina. Tras la licuefacción de la muestra, ésta se diluye con el medio de congelación en proporción 1:1 y tras 20 minutos de reposo a temperatura ambiente, se alícuota en pajuelas de congelación de 0.25 mL de distintos colores y se le asigna un código para la identificación de cada paciente. La congelación se realiza en vapores de nitrógeno líquido mediante el congelador Nicool LM 10 (Air Liquide, Francia) y la velocidad del rotor del aparato se programa para producir el descenso de la temperatura a razón de 5°C/minuto (6 minutos, hasta -10°C). Una vez alcanzada la temperatura de -10°C se aumenta la velocidad de rotación para conseguir una disminución de temperatura a razón de 5,5°C/minuto (durante 20 minutos hasta -120°C) transcurrido ese tiempo las muestras son introducidas en contenedores de nitrógeno líquido y almacenadas a -196°C. Al día siguiente se descongela una alícuota colocando una pajuela en un baño a 37°C durante unos minutos y evaluando la movilidad espermática, calculándose el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos respecto al porcentaje en fresco mediante la siguiente fórmula:

Test de descongelación = (% espermatozoides móviles progresivos postdescongelación * 100) / (% espermatozoides móviles progresivos previo a la congelación)

Se presenta la media y desviación estándar de las variables cuantitativas. La comparación de estas variables entre los distintos tipos de cáncer y en pacientes oncológicos frente a varones fértiles se realizó mediante test no paramétricos (Kruskal-Wallis o Wilcoxon, respectivamente). La comparación de va-

riables cualitativas se realizó mediante el test de la Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Entre Febrero de 1986 y Diciembre de 2002, 141 hombres con una edad media de 31 años (16-51 años) fueron remitidos a nuestra Unidad por distintas unidades clínicas para criopreservación de semen antes de someterse a cualquier tratamiento oncológico. Dieciséis pacientes tuvieron menos de 18 años, y ninguno menos de 16 años.

Veinticinco (17,7%) pacientes estaban diagnosticados de linfoma de Hodgkin, 59 (41,8 %) de cáncer testicular, 24 (17,0%) de leucemia o linfoma no Hodgkin, y 33 (23,4%) de otros tipos de cáncer (recto, próstata, pulmón, histiocitomas, astrocitomas y radmiocarcinoma). En la figura 1 se describe la evolución de las solicitudes de criopreservación según el tipo de cáncer. Se observa un incremento generalizado de la demanda en los últimos años en especial en pacientes con cáncer testicular. De los pacientes no tratados, un 74,13% (n=86) fueron aptos para la congelación de semen, el resto un 25,9% (n=30) no congeló por mala calidad seminal. El porcentaje de sémenes no aptos para congelación se ha reducido en los últimos años (1986-1997: 50,0% vs 1998-2002: 16,6%; p<0,001).

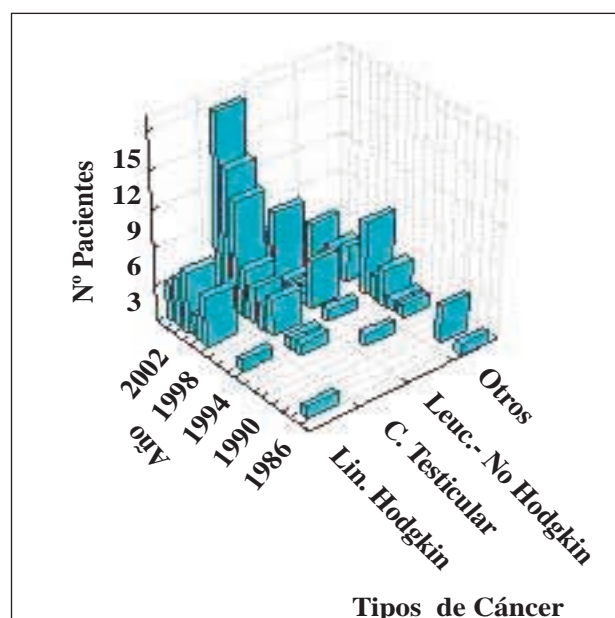


Figura 1

Evolución de la demanda de criopreservación de semen según el tipo de cáncer.

Los pacientes con cáncer presentan en general una menor calidad seminal que varones fértiles (Tabla 1), presentando menor supervivencia espermática tras la descongelación ($p < 0,01$). No obstante, cuando comparamos esta supervivencia en pacientes oncológicos normozoospermicos según los criterios de la OMS con varones fértiles no encontramos diferencias significativas.

Por otra parte, aunque la concentración espermática y porcentaje de varones con criptozoospermia o azoospermicos es mayor en cáncer testicular que en otro tipo de cáncer, estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas. Tampoco hemos observado diferencias significativas en la supervivencia espermática tras descongelación entre varones con cáncer testicular y otros tipos de cáncer. De igual manera tampoco hemos encontrado diferencias entre semen de varones con seminoma y otro tipo de cáncer testicular (Tabla 2).

Cuatro varones (4,7%) intentaron hacer uso de semen congelado, aunque a uno de ellos no se le pudo aplicar Técnicas de Reproducción Asistida ya que en el año 1989 no se disponía de ICSI y la muestra no era óptima para Inseminación Artificial ni para FIV. A los 3 restantes se le aplicó ICSI, uno de ellos realizó dos intentos y otro un intento, todos sin éxito. Un tercero que había recibido quimioterapia previo a la

congelación realizó un intento, con embarazo y nacimiento de una niña sana. (Tabla 3)

DISCUSIÓN

Consideramos que el número de pacientes remitidos a nuestra Unidad para crioconservación de semen a lo largo de estos años es bajo si lo comparamos con la incidencia de cáncer en nuestro entorno en edades reproductivas (14). Entre las causas que determinan esta demanda están: accesibilidad a la técnica y concienciación del personal clínico que atiende al paciente.

Aunque en los últimos años se viene describiendo un aumento en la incidencia de cáncer testicular (15) no creemos que este aumento justifique el aumento observado por nosotros en la demanda de crioconservación de semen en estos pacientes, ya que otros tipos de cáncer han aumentado su incidencia (16) y sin embargo la demanda de crioconservación de semen no se ha disparado. En nuestra opinión este incremento se debe probablemente a una mayor implicación de los especialistas (urólogos) que tratan a estos pacientes frente a la de los especialistas que tratan otro tipo de cáncer (hematólogos, digestivos,...). Esta participación del personal clínico es determinante en el funcionamiento de un banco de semen de pacientes on-

Tabla 1

Estudio del efecto de la crioconservación de semen en todos los pacientes oncológicos, en los pacientes oncológicos normozoospermicos y en varones normozoospermicos

	Total pacientes con cáncer	Cáncer normozoospermicos	Pre-vasectomía
Nº pacientes	86	16	47
Concentración (mill/ml)	41,3 ± 12,3 (4-197)	75,8 ± 46,7 (20-192)	80,6 ± 55,5* (7-287)
Movilidad a (%)	22,9 ± 17,2 (0-65)	45,3 ± 6,8 (7-70)	44,2 ± 19,8 * (5-75)
Movilidad a+b (%)	33,9 ± 17,9 (0-75)	55,9 ± 4,8 (50-65)	53,0 ± 15,5 * (20-80)
Movilidad Total (%)	42,2 ± 18,3 (2-100)	62,5 ± 10,9 (50-65)	58,5 ± 13,9 * (30-90)
Test descongelación (%)	27,7 ± 15,1 (5-65)	38,7 ± 14,4 (5-65)	37,5 ± 18,6* (5-70)

Media ± DS (mín-máx).

* $p < 0,01$ Total pacientes con cáncer vs prevasectomía.

Tabla 2

Comparación de calidad seminal entre pacientes con cáncer testicular, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y Leucemia y otros tipos de cáncer.

	C. Testicular n=49		Linfoma Hodgkin Leucemia	L. no Hodgkin-	Otros
	Seminoma	No seminoma			
Nº pacientes	18	31	20	19	19
Edad (años)	29,3 ± 3,8 (24-33)	25,3 ± 4,3 (16-34)	27,0 ± 6,4 (16-42)	25,7 ± 5,3 (19-33)	31,5 ± 9 (17-45)
Pacientes Cripto ó Azoospermicos	10 (32,2%)	12 (38,7%)	4 (20%)	5 (26,3%)	7 (36,8%)
Concentración (millones/ml)	22,4 ± 27,6 (5-120)	19,2 ± 43,8 (0-155)	32,03 ± 38,7 (6-114)	32,6 ± 42,5 (5-145)	32,5 ± 44,6 (0,5-192)
Movilidad total (%)	37 ± 30,3 (5-55)	31,8 ± 23,5 (2-65)	34,3 ± 24,1 (5-62)	31,9 ± 23,7 (5-65)	38,2 ± 23,5 (2-100)
Test descongel. (%)	18,2 ± 21,47 (0-50)	17,0 ± 17,5 (0-60)	16,6 ± 16,7 (0-55)	20,5 ± 20,9 (0-55)	22,1 ± 16,7 (1-65)
Media ± DS (mín.-máx.); No significativo					

Tabla 3

Resultado del uso de semen crioconservado de pacientes oncológicos mediante reproducción asistida.

Casos	Diagnóstico	Método (R.A.)	Nº Ciclos	Embarazos a término
1	C. Testicular	ICSI	2	0
2	C. Testicular	ICSI	1	1
3	L. Hodgkin	ICSI	1	0

cológicos. Por otra parte, ningún paciente remitido a nuestra unidad fue menor de 16 años. Actualmente, desde un punto de vista exclusivamente científico, la congelación de semen en pacientes adolescentes se considera una opción válida para conservar la fertilidad. No obstante presenta aspectos éticos, legales y psicológicos controvertidos (17,18).

En general se acepta que el cáncer afecta a la calidad seminal tanto si es a nivel testicular (3, 5, 8) como sistémico (1, 8). Resultados que coinciden con nuestra experiencia (Tabla 1). Donde existe una mayor discrepancia es en qué tipos de cáncer afectan más a la calidad seminal. Algunos autores afirman, que el cáncer testicular en general (3, 5), y el seminoma en particular (5), afecta más a la calidad seminal que los cánceres hematológicos. Y dentro de estos últimos el linfoma de Hodgkin afecta más a la calidad seminal que el linfoma no Hodgkin o leucemia (5,

19). Nuestros resultados (Tabla 2) y los de Padron et al.(8) no confirman estas diferencias y sugieren que el efecto negativo del cáncer sobre la espermatogénesis es similar si el cáncer es sistémico o local. Las discrepancias con los autores anteriores pueden deberse a que al contrario que nosotros y Padrón et al.(8) muchos de los trabajos citados comparan resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

La mala calidad seminal comentada en pacientes oncológicos ha llevado a autores a hablar de pobres resultados tras la descongelación, sugiriéndose que los espermatozoides de pacientes oncológicos resisten peor la congelación (20). Nuestra experiencia demuestra que si bien es verdad que los pacientes oncológicos tienen peor calidad seminal que individuos sanos fértiles, cuando se compara el efecto de la congelación en pacientes con cáncer normozoospermicos, éste es el mismo, por lo que podemos afirmar

que el cáncer directamente no afecta a la supervivencia espermática tras descongelación, sino a la calidad seminal en general (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los observados por otros autores como Argawal et al. (21)

El descenso observado en nuestra Unidad en el porcentaje de varones oncológicos con semen no apto para la congelación se debe a que nuestro centro en 1998 incorporó la técnica de ICSI a su cartera de servicios, y desde ese momento muestras de semen antes desechadas por mala calidad pasaron a congelarse, pues dicha técnica permite realizar la fecundación de un ovocito con un solo espermatozoide. De hecho, el único embarazo conseguido en nuestro centro tras la utilización de semen congelado en pacientes oncológicos ha sido mediante microinseminación espermática. El riesgo de malformaciones o alteraciones cromosómicas en la descendencia de pacientes con cáncer tras completar la quimioterapia y/o radioterapia no es diferente al de la población sana (22-24), a pesar de que algunos autores han observado un incremento de anomalías cromosómicas en espermatozoides de estos pacientes (25).

Nuestra experiencia y la de la mayoría de autores (5, 8, 9) indican que solo entre el 3-10% de los enfermos con cáncer y con semen congelado utilizan posteriormente dicho material. Las causas de ésta escasa utilización son múltiples: recuperación de la función gonadal, no deseo de paternidad, falta de confianza en el material biológico congelado o en las técnicas de reproducción asistida y muerte del paciente.

Desde que en el año 1995 se consiguió el primer embarazo con espermatozoides testiculares crioconservados (26) y dos años más tarde se describió el nacimiento del primer niño obtenido mediante esta técnica en pacientes oncológicos (27), algunos autores han sugerido la posibilidad en pacientes oncológicos azoospermicos o prepuberales realizar congelación de tejido testicular no solo para usar los posibles espermatozoides testiculares, práctica hoy día habitual en los centros de reproducción asistida, sino para realizar inseminación intracitoplasmática con espermáticas, maduración in vitro células germinales inmaduras o autotrasplante de células madre espermatogonias (28). Nosotros, al igual que otros autores (15, 29) creemos que estas tres últimas alternativas deben de considerarse experimentales y no exentas de riesgo como se ha demostrado en el modelo murino (30).

En resumen, nuestra experiencia indica que la crioconservación de semen en pacientes oncológicos unido a su posterior uso con técnicas de reproducción asistida es un método válido para preservar la fertilidad. El incremento de su demanda dependerá en gran

medida de su accesibilidad y de la implicación del personal clínico que atiende a estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Fossa S, Aass N, Molne K.:** Is routine pre-treatment cryopreservation of semen worthwhile in the management of patients with testicular cancer. *Br J Urol* 1989; 64:524-29.
2. **Meirow ED, Schenker JG.:** Cancer and male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10:2017-22.
3. **Botchan A, Hauser R, Yogev L, Gamzu R, Paz G, Lessing JB.:** Testicular cancer and spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997; 12:755-58.
4. **Holschneider CH, Montz J.:** Radiation and chemotherapy and the effects on the menstrual cycle and reproduction. *Infert Reprod Med Clin of North America* 1998; 9:739-67.
5. **Lass A, Akagbosu F, Abusheika N, Hassouneh M, Blayney M, Avery S.:** A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lesson from 8 Years' experience. *Hum Reprod* 1998; 13:3256-61.
6. **Lass A, Abusheikha N, Akagbosu F, Brinsden P.:** Cancer patients should be offered semen cryopreservation. *Br Med J* 1999; 318:1556.
7. **Sanger WG, Olson JH, Sherman JK.:** Semen cryobanking for men with cancer-criteria change. *Fertil Steril* 1992; 58:1024-27.
8. **Padron OF, Sharma RK, Thomas AJ, Argawal A.:** Effects of cancer on spermatozoa quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertil Steril* 1997; 67:326-31.
9. **Rhodes EA, Hoffman DJ, Kaempfer SH.:** Ten Years of experience with semen cryopreservation by cancer patients: follow-up and clinical considerations. *Fertil Steril* 1985; 44:512-16.
10. **Chapman RM.:** Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 1982; 9:9-84.
11. **Rothman C.:** The usefulness of sperm banking. *CA Cancer J Clin* 1980; 30:186-88.
12. **Horne G, Atkinson A, Brison DR, Radford J, Yin JAL, Edi-Osagie ECO et al.:** Achieving pregnancy against the odds: successful implantation of frozen-thawed embryos generated by ICSI using spermatozoa banked prior to chemo/radiotherapy for Hodgkin's disease and acute leukaemia. *Hum Reprod* 2001; 16:107-09.
13. **Shee-Uan C, Hong Nerng H, Hsin-fu C, Su-Cheng H, Tzu-Yao L, Yu-Shih Y.:** Pregnancy achieved by intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved semen from a man with testicular cancer. *Hum Reprod* 1996; 11:2645-47.
14. **Miñarro R, Black R.J, Martínez C, Navarro C,**

- Garau I, Izarzuagaza I et al.:** Incidencia y mortalidad por cáncer en España. Patrones y Tendencia. Rev Esp Salud Pública 2000; 74:581-82.
15. **Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM.:** Who manual for the standardirzed investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
 16. **Pollan M, López-Abente G, Moreno C, Vergara A, Aragonés N, Ruiz M et al.:** Rinsig incidente of non-Hodkin's Lymphoma in Spain: análisis of period of diagnosis cohort effects. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7:621-5.
 17. **Bahadur G, Chatterjee R, Ralph D.:** Testicular tissue cryopreservation in boys Ethical and legal issues. Hum Reprod 2000; 15:1416-20.
 18. **Bahadur G, Ling KL, Hart R, Ralph D, Riley V, Wafa A et al.:** Semen production in adolescent cancer patients. Hum Reprod 2002; 17:2654-56.
 19. **Botchan A, Hauser R, Gamzu R, Yogev L, Lessing JB, Paz G et al.:** Sperm quality in Hodgkin's disease versus non-Hodgkin's lymphoma. Hum Reprod 1997; 12:73-76.
 20. **Fossa S, Aass N, Molne K.:** Is routine pre-treatment cryopreservation of semen worthwhile in the management of patients with testicular cancer. Br. J. Urol 1989; 64:524-29.
 21. **Agarwal A, Newton RA.:** The effect of cancer on semen quality after cryopreservation of sperm. Andrología 1991; 23:329-32.
 22. **Babosa M, Baki M, Bodrogi I, Gundy S.:** A study of children, fathered by men treated for testicular cancer, conceived before, during and after chemotherapy. Med Pediatr Oncol 1994; 22:33-38.
 23. **Hansen PV, Glavind K, Panduro J, Pedersen M.:** Paternity in patients with testicular germ cell cancer: pre-treatment and post-treatment findings. Eur J Cancer 1991; 27:1385-89.
 24. **Nygaard R, Clausen N.M, Siimes M.A.:** Reproduction following treatment for childhood leukaemia: a population based prospective cohort study of fertility and offsprings. Med Pediatr Oncol 1991; 19:459-66.
 25. **Martin RH, Hildebran K, Yamamoto J, Rademaker A, Barnes M, Douglas G et al.:** An increase frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. Mutat Res 1986; 174:219-25.
 26. **Craft I, Tsirigotis M.:** Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10:1623-27.
 27. **Yavetz H, Hauser R, Botchan A.:** Pregnancy resulting from frozen-thawed embryos archived by intracytoplasmic injection of cryopreserved sperm cells extracted from an orchidectomized, seminoma-bearing testis, causing obstructive azoospermia. Human Reprod 1997; 12:2836-38.
 28. **Bahadur G, Ralph D.:** Gonadal tissue cryopreservation in boys with paediatric cancers. Hum Reprod 1999; 14:11-17.
 29. **Sousa M, Cremades N, Alves CI, Silva J, Barros A.:** Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultures with Sertoli cells. Hum Reprod 2002; 17:161-72.
 30. **Jahnukainen K, hou M, Petersen C et al.:** Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukaemia. Cancer Res 2001; 61:706-10.