

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Ana Leticia Müller

Material didático sobre análise do sêmen humano

Florianópolis

2022

Ana Leticia Müller

Material didático sobre análise do sêmen humano

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Müller, Ana Leticia

Material didático sobre análise do sêmen humano / Ana Leticia Müller ; orientadora, Fabiana Botelho de Miranda Onofre, 2022.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Material didático. 3. Espermograma. I. Onofre, Fabiana Botelho de Miranda. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico este trabalho a minha família, que sempre me deu todo amor e apoio para que eu fosse
a pessoa que sou hoje.

Dedico também aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado dando força e
entusiasmo para vencer todas as etapas da graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sempre presente em minha vida e dando sentido a tudo o que faço.

Aos meus pais, Sandra e Lauro, pelo exemplo que sempre me deram de força, dedicação e persistência. Vocês dois são pilares de amor e sabedoria. Obrigada mãe, por nunca me deixar desistir e sempre me lembrar de que “eu quero, eu posso, eu consigo”. Dedico muito esta conquista a você!

À minha irmã Laura, confidente, ombro amigo e companheira para todas as horas. Você me faz querer ser sempre um ser humano melhor. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos de crise acadêmica, me ouvir e me ajudar, inclusive na gramática.

Aos meus amigos e colegas de curso, Bruno, Ana Carolina, Raíssa e Paula. Como foi bom conhecê-los e poder contar com vocês nos períodos conturbados e felizes da graduação. Agradeço por todos os momentos e conversas terapêuticas. Além da amizade, vocês sempre foram exemplos de responsabilidade e ética dentro da nossa profissão. Bruno e Ana Carolina, muito obrigada a toda ajuda que me deram para a conclusão deste trabalho!

Agradeço a todos os professores que fizeram parte dessa caminhada por todos os ensinamentos e exemplos profissionais. Agradeço especialmente aos professores da disciplina de Citologia Clínica, que despertaram em mim a paixão por análises clínicas e me fizeram persistir nesta área. E, principalmente, agradeço de coração a minha orientadora, Fabiana, por estar comigo em vários anos da minha graduação, sendo uma professora maravilhosa. Obrigada pela paciência e dedicação.

À Ane, pela grande ajuda no trabalho, companhia e amizade. Foi muito bom passar momentos contigo e poder conhecer a pessoa tão querida e dedicada que você é. Te admiro muito e sei que seu futuro será de muito sucesso!

Não poderia deixar de lembrar daqueles seres únicos no mundo que não vão poder ler meus agradecimentos, mas sabem que foram de fundamental importância para minha felicidade, por me darem forças para continuar e o amor mais puro que existe.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão”.

(São Francisco de Assis)

RESUMO

A qualidade do sêmen da população mundial vem diminuindo ao longo das décadas e a realização do espermograma é importante para avaliação da infertilidade masculina, juntamente com a observação clínica de cada paciente. O trabalho tem como objetivo ser um material didático sobre análise do sêmen humano, rico em conhecimentos específicos, a fim de que alunos e profissionais da área possam consultar e ter orientações para as análises do espermograma. O material didático contém informações retiradas de fontes científicas, como livros, manuais e artigos atualizados sobre o tema, que abordam tópicos teóricos e práticos utilizados nas análises do sêmen humano e foram reunidos para facilitar a consulta e realização do exame. Além de textos explicativos, o trabalho contém imagens obtidas de amostras analisadas no laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina. Os tópicos abordados no trabalho envolvem a coleta da amostra de sêmen humano, as análises macroscópicas do sêmen (liquefação, viscosidade, aspecto do ejaculado, volume, odor e pH) e as análises microscópicas do sêmen (avaliação da diluição apropriada do sêmen humano, agregados de espermatozoides, aglutinação de espermatozoides, motilidade, vitalidade espermática, contagem de espermatozoides e outras células e morfologia dos espermatozoides).

Palavras-chave: material didático; sêmen humano; espermograma; infertilidade masculina.

ABSTRACT

The semen quality of the world's population has been decreasing over the decades and the performance of the spermogram is important for the evaluation of male infertility, along with the clinical observation of each patient. The work has the goal of being a didactic material about human semen analysis, rich in specific knowledge, that students and professionals in the field can consult and have guidelines for sperm analysis. The didactic material contains information taken from scientific sources, such as books, manuals and updated articles about the subject, which approach theoretical and practical topics used in human semen analysis and were brought together to facilitate consultation and exam realization. In addition to explanatory texts, the work contains images obtained from samples analyzed in the Clinical Cytology laboratory of the Federal University of Santa Catarina. Topics used in the work involve the collection of human semen samples, macroscopic analysis of semen (liquefaction, viscosity, appearance of the ejaculate, volume, odor and pH) and microscopic analysis of semen (evaluation of appropriate dilution of human semen, sperm aggregates, sperm agglutinates, motility, sperm vitality, sperm counting and other cells and sperm morphology).

Keywords: didactic material; human semen; spermogram; male infertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação inicial microscópica de amostra de sêmen humano, ampliação de 400x	23
Figura 2 - Espermatozoide morto à esquerda e espermatozoide vivo à direita, coloração de eosina-nigrosina, ampliação de 1000x	28
Figura 3 - Câmara de Neubauer e lamínula, utilizada para contagem do número de espermatozoides	30
Figura 4 - Áreas de contagem da câmara de Neubauer	31
Figura 5 - Limite de contagem para as linhas dos quadrados menores centrais da câmara de Neubauer	32
Figura 6 - Câmara de Makler sendo preenchida com gota de amostra de sêmen	35
Figura 7 - Esquema de visualização da câmara de Makler em microscópio	35
Figura 8 - Categorias de anormalidade espermática com exemplos de alterações	38
Figura 9 - Anormalidade de cabeça: amorfa; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x	39
Figura 10 - Anormalidade de peça intermediária: inserção acentuadamente angulada; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x	39
Figura 11 - Anormalidade de cauda: dupla; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x	40
Figura 12 - Espermatozoide e célula epitelial; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valor de referência para o volume de sêmen humano para o quinto percentil com intervalo de confiança (IC) de 95%	211
Quadro 2 - Esquema representando os graus de aglutinação de espermatozoides	25
Quadro 3 - Valor de referência para a motilidade dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%	27
Quadro 4 – Valor de referência para espermatozoides imóveis para o quinto percentil com IC 95%.....	27
Quadro 5 - Valor de referência para a vitalidade dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%	29
Quadro 6 - Valor de referência para a concentração de espermatozoides no sêmen humano para o quinto percentil com IC 95%	34
Quadro 7 - Valor de referência para o número total de espermatozoides por ejaculado para o quinto percentil com IC 95%	34
Quadro 8 - Valor de referência para formas normais dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluições para a amostra de sêmen humano	24
Tabela 2 – Valor do fator de correção para cálculo da concentração a partir da contagem de espermatozoides	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	METODOLOGIA.....	15
3.1	CARACTERÍSTICAS DA PESQUISA	15
3.2	FOTOGRAFIAS E FOTOMICROGRAFIAS	15
4	JUSTIFICATIVA	17
5	REVISÃO TEÓRICA	18
5.1	COLETA DA AMOSTRA DE SÊMEN	19
5.2	ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SÊMEN.....	20
5.2.1	Liquefação	20
5.2.2	Viscosidade	20
5.2.3	Aspecto do ejaculado	21
5.2.4	Volume	21
5.2.5	Odor	22
5.2.6	pH.....	22
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SÊMEN	22
5.3.1	Avaliação da diluição apropriada do sêmen humano	23
5.3.2	Agregados de espermatozoides	24
5.3.3	Aglutinação de espermatozoides	24
5.3.4	Motilidade.....	25
5.3.4.1	<i>Categorias da motilidade espermática.....</i>	26
5.3.5	Vitalidade espermática	28
5.3.5.1	<i>Técnica de coloração com eosina-nigrosina</i>	29
5.3.6	Contagem de espermatozoides e outras células	29
5.3.6.1	<i>Câmara de Neubauer.....</i>	30
5.3.6.1.1	<i>Avaliação do número de espermatozoides na câmara de Neubauer</i>	32
5.3.6.1.2	<i>Cálculo da concentração do sêmen a partir da contagem de espermatozoides</i>	33
5.3.6.1.3	<i>Cálculo do número total de espermatozoides</i>	34
5.3.6.2	<i>Câmara de Makler.....</i>	34
5.3.7	Morfologia dos espermatozoides	36

5.3.7.1	<i>Avaliação microscópica da morfologia espermática</i>	37
5.3.7.2	<i>Categorias de anormalidade espermática</i>	37
5.3.8	Preparação de esfregaços de sêmen	41
5.3.9	Coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG)	41
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do sêmen na população global vem diminuindo ao longo das décadas e o estilo de vida levado pelo indivíduo é responsável por esse declínio. Fatores como o consumo de álcool, tabagismo, obesidade, estresse e uso de drogas ilícitas são responsáveis por diminuir a qualidade do sêmen por alteração na concentração dos espermatozoides, a qual se torna reduzida, e também alterações na motilidade e morfologia dos espermatozoides (DURAIRAJANAYAGAM, 2018). Os fatores ambientais e ocupacionais também são responsáveis pelo aumento do risco da infertilidade masculina. A exposição do homem a vários produtos químicos, incluindo metais pesados e pesticidas, está associada a efeitos adversos de parâmetros seminais, como efeitos prejudiciais na concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides, e também no volume de sêmen (PAPARELLA *et al.*, 2017).

Um estudo de 2022 sobre candidatos a doação de esperma de um Banco Público de Gametas Português mostrou tendência de diminuição dos níveis de espermatozoides com morfologia normal entre 2011 e 2018. Uma diminuição na motilidade progressiva também foi observada à medida que o índice de massa corporal (IMC) era mais elevado nos participantes. Parâmetros alterados da amostra de sêmen interferem na fertilidade masculina, sendo que a maioria das causas identificadas de diminuição da qualidade do esperma são fatores modificáveis (FONSECA *et al.*, 2021).

A avaliação da infertilidade masculina é inicialmente realizada pela análise do sêmen. O manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2021 para análise do sêmen utiliza publicações baseadas em evidências como referencial para definir os valores de normalidade e as diretrizes utilizadas para tal. A 5ª edição do manual de 2010 utilizou evidências e valores obtidos de uma população de 1.953 homens férteis de oito países diferentes que se tornaram pais em menos de 12 meses, cujas esposas também possuíam fecundidade alta ou normal (FRANKEN; OEHNINGER, 2012). Já a 6ª edição do manual de 2021 incluiu dados de mais de 3.500 indivíduos oriundos de doze países de cinco continentes diferentes; assim, houve maior representatividade da fertilidade masculina pela inclusão de maior número de homens investigados advindos de mais regiões do globo (CAMPBELL *et al.*, 2021).

Materiais visuais e explicativos são uma ferramenta facilitadora da aprendizagem e possibilitam a seus leitores captar informações e organizar conhecimentos específicos sobre o tema. A utilização de diferentes materiais didáticos tem a finalidade de conduzir o raciocínio

para que se construam significados e o conhecimento sobre determinado assunto seja consolidado (SILVA; VICTER, 2016).

Através da utilização de materiais didáticos, o indivíduo poderá obter uma construção de aprendizados sobre os objetos de conhecimento, através de situações diversas que ocorreram no meio em que vivem, atribuindo qualidades e valores. Acredita-se, portanto, que podem contribuir para a obtenção da construção da identidade, construção do próprio sujeito e sua visão de mundo (MATOS; SILVA; VICENTE, 2021, p. 318).

A utilização de diferentes recursos didáticos direciona o aprendizado dos estudantes. “Independente de como e quando podemos classificar esses recursos como os visuais, auditivos, ou audiovisuais que são a junção dos dois recursos tornando o ensino mais dinâmico e interessante” (BORDINHÃO; SILVA, 2015, p. 7).

No âmbito das análises clínicas, a utilização do microscópio óptico é um recurso fundamental. A existência de materiais didáticos visuais que auxiliam a caracterização microscópica das análises realizadas melhora a compreensão dos conceitos pelo aluno, podendo motivá-lo no aprendizado da disciplina (ARRUDA *et al.*, 2021).

O presente projeto busca a produção de material didático sobre análise do sêmen humano com o objetivo de auxiliar e contribuir com os estudos dos alunos da disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas (ACL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e também de várias outras universidades, além de profissionais que realizam as análises de sêmen em sua rotina laboratorial.

O material didático também contará com material explicativo sobre as células visualizadas no espermograma, como se dá a coleta do material biológico e preparo do paciente, análises macroscópicas (tempo de liquefação, viscosidade, aspecto, volume e pH) e microscópicas (motilidade, vitalidade, contagem do número total de espermatozoides, contagem de células não espermáticas e morfologia dos espermatozoides).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral a produção de um material didático sobre a análise do sêmen humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as análises macroscópicas realizadas com a amostra de sêmen humano.
- Descrever as análises microscópicas realizadas com a amostra de sêmen humano.
- Preparar fotomicrografias dos espermatozoides sobre sua morfologia e vitalidade.

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERÍSTICAS DA PESQUISA

A pesquisa realizada para a produção do presente trabalho possui cunho bibliográfico de caráter descritivo e qualitativo. Isto se dá através da produção textual e de imagens através de micrografias de material biológico e instrumentos utilizados para a realização do espermograma.

Para elaboração do material teórico e explicativo, foram utilizados manuais de laboratório disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os materiais disponibilizados pela agência governamental são atualizados e possuem valores de referência para as características do sêmen utilizado em todo o mundo. Também foram utilizados livros sobre a temática e artigos científicos relevantes para a produção do material. Os artigos foram selecionados a partir das bases de dados PubMed, ScienceDirect e do portal Scientific Electronic Library Online (SciELO). Os descritores utilizados para a pesquisa foram “semen analysis”, “spermogram”, “importance” e “infertility”, além dos mesmos termos em língua portuguesa. Em adição aos termos já citados, as mesmas bases de dados foram utilizadas para a pesquisa de termos específicos para busca de informações adicionais, como métodos de coloração.

O material biológico utilizado para a obtenção das imagens que compõem o material didático foi obtido de amostras que estavam sendo analisadas no laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2 FOTOGRAFIAS E FOTOMICROGRAFIAS

As fotografias dos materiais foram obtidas utilizando-se a câmera do iPhone 7 (12 megapixels) e um fundo preto padrão. As fotomicrografias dos espermatozoides foram obtidas a partir de um software (MotiCyte versão 2; Motic, Xiamen, China) acoplado ao microscópio (Motic BA410™) e câmera de vídeo colorida (Moticam Pro 285A™; 1.4 megapixels, 1360 x 1024 pixels).

As imagens produzidas para o presente trabalho envolvem o registro de elementos macroscópicos e microscópicos para a realização do espermograma. Os elementos macroscópicos fotografados são relacionados aos equipamentos utilizados (câmara de Neubauer e câmara de Makler). As imagens microscópicas de lâminas coradas registradas contemplam a vitalidade dos espermatozoides, sua morfologia, incluindo alterações da cabeça, peça intermediária e da cauda.

Após a produção das fotografias dos equipamentos, as mesmas foram selecionadas para cada tópico do trabalho, recebendo edição de nitidez, recorte e ajuste no aplicativo de fotos do próprio iPhone para centralização das estruturas. Além disso, foi realizada a padronização da coloração do fundo pelo aplicativo Photoshop. As fotomicrografias das lâminas de morfologia e vitalidade dos espermatozoides foram selecionadas a fim de se obter o melhor fundo e melhor visualização dos espermatozoides e de outras células.

4 JUSTIFICATIVA

O material didático é um material instrutivo para consulta, buscando o estabelecimento da relação entre teoria e prática e possibilitando a elaboração do estudo autônomo (BENTO, 2017). Os materiais didáticos visuais complementam o conteúdo textual, pois promovem a apresentação de informações de forma mais interessante, criativa e organizada. A construção do conhecimento é facilitada por conteúdos visuais, permitindo a articulação do significado pela união entre texto e imagem (FREITAS; RODRIGUES, 2008). A utilização de diferentes materiais didáticos tem a finalidade de conduzir o raciocínio para que se construam significados e o conhecimento sobre determinado assunto seja consolidado (SILVA; VICTER, 2016).

O presente material didático sobre a análise do sêmen humano tem como base a 6ª edição do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) que foi atualizada em 2021. Os métodos e procedimentos descritos para análise de cada parâmetro do sêmen humano poderão ser utilizados como procedimento operacional padrão (POP) em qualquer laboratório que realize o espermograma; assim, a padronização das análises descritas pelos laboratórios melhora a qualidade do exame do sêmen humano e também a comparabilidade dos resultados entre laboratórios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A produção do material didático sobre a análise do sêmen poderá auxiliar alunos e profissionais da área nos estudos sobre o tema. Este recurso didático poderá ser utilizado com a finalidade de ser um modelo para estudo teórico e prático das análises realizadas no sêmen, a fim de facilitar a realização das mesmas em ambiente laboratorial.

5 REVISÃO TEÓRICA

O sêmen ejaculado possui atributos quantificáveis para a análise, que são o número total de espermatozoides e o volume total dos fluidos advindos das glândulas acessórias. Os outros aspectos igualmente importantes para a análise da função espermática são a vitalidade, motilidade e morfologia dos espermatozoides, como também a composição dos fluidos do ejaculado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Ao examinar a morfologia espermática corretamente, seguindo as diretrizes preconizadas no manual da OMS para análise do sêmen, a avaliação do aspecto morfológico dos espermatozoides desempenha um papel muito importante na avaliação clínica da fertilidade masculina (FRANKEN; OEHNINGER, 2012).

Nas primeiras frações do sêmen ejaculado é onde se encontra a maior parte dos espermatozoides e, dessa forma, é a fração mais favorável a entrar em contato com o muco cervical antes da mistura com as porções líquidas (BJÖRNDAHL; KVIST, 2003). Isso mostra a importância da coleta total da amostra de sêmen, o que influenciará na qualidade da amostra a ser analisada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). É importante analisar no mínimo duas amostras de sêmen para a investigação da infertilidade masculina, além da avaliação médica completa do histórico reprodutivo e exame físico realizado por um especialista (SHARLIP *et al.*, 2002).

Os espermatozoides maduros são células ativas e móveis, constituídos por cabeça e cauda, esta última dividida em peça intermediária, peça principal e peça terminal (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). O acrossomo presente na cabeça do espermatozoide contém várias enzimas hidrolíticas e uma protease, todas capazes de lisar as estruturas que envolvem os ovócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Já a peça intermediária possui mitocôndrias que fornecem energia por meio de trifosfato de adenosina (ATP) para que o espermatozoide tenha motilidade (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

A espermatogênese tem início na puberdade e é influenciada por vários fatores, dentre os quais os de maior importância são os hormônios, segundo Junqueira e Carneiro (2017). O hormônio folículo-estimulante (FSH) estimula as células de Sertoli para a conversão das espermátides em espermatozoides. O hormônio luteinizante (LH) age nas células de Leydig, que são as células intersticiais, e as estimula a secretarem a testosterona, hormônio fundamental para o crescimento e divisão das células germinativas (GUYTON; HALL, 2011). Outro fator importante no processo de espermatogênese é a temperatura, pois a produção dos

espermatozoides só ocorre abaixo da temperatura corporal, cerca de 35°C nos testículos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Segundo Moore, Persaud e Torchia (2016), a formação dos espermatozoides tem início com a transformação das espermatogônias em espermatócitos primários, destes em espermatócitos secundários e por fim estes se transformam em espermátides, que são as células que darão origem aos espermatozoides. O processo de transformação das espermátides em espermatozoides é chamado de espermiogênese e inclui vários processos, como a formação do acrossomo, alongamento e condensação do núcleo, crescimento do flagelo e perda de porção citoplasmática (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Segundo Junqueira e Carneiro (2017), após a formação dos espermatozoides eles são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e são transportados para o epidídimo pelo fluido testicular, onde são armazenados e amadurecem. Os espermatozoides móveis e férteis possuem velocidade em meio líquido de 1 a 4 mm/min. A atividade do espermatozoide aumenta em meio neutro ou levemente alcalino, enquanto a mesma é muito diminuída em meio ligeiramente ácido (GUYTON; HALL, 2011).

5.1 COLETA DA AMOSTRA DE SÊMEN

A amostra de sêmen deve ser coletada por meio de masturbação em sala privada próxima ao laboratório que fará a análise, para que o paciente tenha a privacidade necessária para a coleta. Alguns requisitos são necessários para o procedimento de coleta da amostra de sêmen humano, como coleta em um recipiente limpo, de boca larga e composto por material que não seja tóxico para os espermatozoides. Além disso, a abstinência sexual no momento da coleta deve ser de no mínimo 2 e no máximo 7 dias (OSHIO et al., 2007).

A fração total do ejaculado deve ser coletada e qualquer perda de amostra deve ser comunicada ao laboratório; estas informações devem ser fornecidas para o paciente, por fala ou escrita e de forma clara (SUNDER; LESLIE, 2022). O recipiente deve possuir a identificação do paciente como nome, número de identificação, data e hora da coleta e, após o recebimento da amostra no laboratório, deve ser deixado em bancada ou incubadora (37°C) para que o sêmen possa se liquefazer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Caso a coleta seja feita em domicílio, excepcionalmente, o paciente deve ser instruído de forma clara sobre a coleta e transporte da amostra de sêmen. A amostra deve ser entregue

ao laboratório preferencialmente dentro de 30 minutos após a coleta e não mais do que 50 minutos após a coleta. Ao ser transportada até o laboratório, a amostra deve ser mantida entre 20 °C e 37 °C; é indicado manter a amostra próxima ao corpo durante o transporte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO SÊMEN

5.2.1 Liquefação

A liquefação do sêmen reflete a função das vesículas seminais e da próstata. O aumento da viscosidade do líquido seminal está relacionado a processos inflamatórios das glândulas acessórias e dificulta a livre movimentação dos espermatozoides (VASQUEZ R; VASQUEZ ECHEVERRI, 2007).

Após alguns minutos em temperatura ambiente, o sêmen começa a se liquefazer e se tornar mais homogêneo. A liquefação ocorre geralmente dentro de 30 minutos e não deve demorar mais de 1 hora, após a ejaculação. Se a liquefação da amostra não se completar em 30 minutos, anotar no relatório final. Caso a amostra não esteja liquefeita ao passar de 60 minutos, também registrar no relatório final (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.2.2 Viscosidade

Após a liquefação da amostra de sêmen, a análise da viscosidade é feita com uma pipeta de plástico descartável (ex.: pipeta Pasteur) de material não tóxico para os espermatozoides. O sêmen deve ser aspirado e seu desprendimento da pipeta por gravidade deve ser observado. A normalidade é dita quando o sêmen cai em gotas pequenas e discretas, mas quando a queda da amostra da pipeta forma um fio com mais de 2 cm de comprimento, é avaliada como viscosidade anormal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Outra possibilidade da análise da viscosidade é a introdução de uma vareta de vidro na amostra. É observado o comprimento do fio formado após a retirada da vareta. A amostra é dita anormal com a formação de fio maior do que 2 cm (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

5.2.3 Aspecto do ejaculado

Amostras normais de sêmen, depois de liquefeitas, possuem coloração branca opalescente e são homogêneas. Outras colorações também podem aparecer de acordo com algumas circunstâncias, como por exemplo, cor marrom-avermelhada quando há presença de hemácias no ejaculado (hemospermia) e coloração amarela devido à icterícia ou administração de vitaminas e medicamentos pelo homem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.2.4 Volume

O volume do sêmen é composto majoritariamente pelos líquidos das vesículas seminais e da próstata, juntamente com uma pequena quantidade dos epidídimos e das glândulas bulbouretrais. A determinação do volume do ejaculado possibilita o cálculo do número total de espermatozoides e também de células não espermáticas no sêmen (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

O volume é medido de maneira direta pela coleta da amostra de sêmen em cilindro de medição graduado e com boca larga com a leitura das graduações do tubo. Entretanto, ao transferir o volume de amostra para um cilindro de medição, ocorre perda de parte da amostra e o volume será subestimado. Desta forma, este não é um procedimento recomendado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A forma mais precisa para a determinação do volume é de forma indireta pela pesagem. A massa do recipiente de coleta deve ser previamente determinada e, após a coleta, pesa-se o recipiente contendo a amostra de sêmen. Subtrai-se o valor do recipiente vazio e o volume é calculado utilizando a massa em gramas deduzida da amostra e a densidade do sêmen, que é de 1 g/ml (AUGER et. al., 1995) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Quadro 1 - Valor de referência para o volume de sêmen humano para o quinto percentil com intervalo de confiança (IC) de 95%

Valor mínimo	1,4 ml (1,3 – 1,5 ml)
--------------	-----------------------

Fonte: World Health Organization (2021)

5.2.5 Odor

Os indivíduos possuem variações na capacidade de perceber o cheiro normal do sêmen humano. Contudo, odores como o de putrefação ou de urina devem ser relatados, pois podem ter importância clínica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.2.6 pH

A avaliação do pH é influenciada pela perda de CO₂ da amostra após a coleta do ejaculado, portanto, o pH deve ser mensurado preferencialmente após 30 minutos do processo de liquefação do sêmen, não devendo ultrapassar 1 hora. A perda de CO₂ causa o aumento gradual do pH (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Para a medição do pH do sêmen, a amostra deve ser bem misturada, mas não vigorosamente, e 1 gota deve ser colocada sobre papel medidor de pH. A amostra deve ser espalhada uniformemente e deve-se aguardar a cor do papel ficar homogênea para a leitura ser realizada. Compara-se a cor do papel medidor com a faixa de calibração (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Valores de pH encontrados abaixo de 7,2 podem indicar a ausência de fluido da vesícula seminal, o qual é alcalino. Um pH abaixo desse valor também pode ser indicativo da contaminação da amostra de sêmen humano por urina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

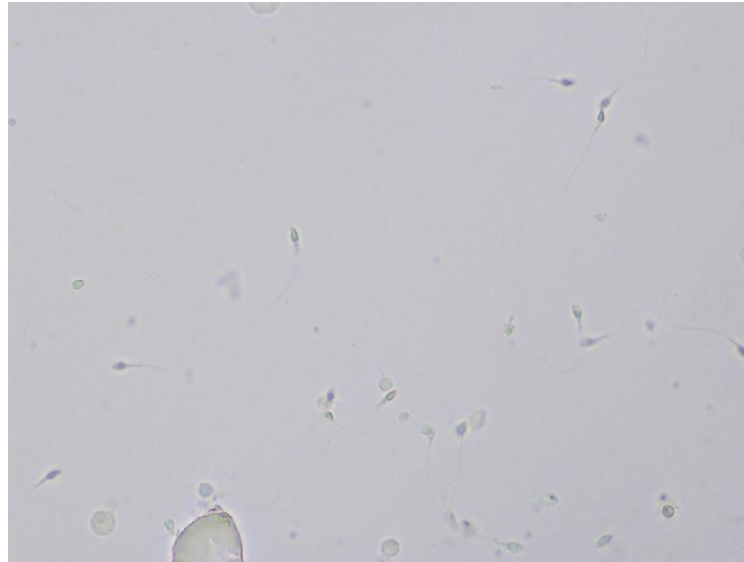
5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SÊMEN

Para a avaliação a fresco, o Manual da OMS recomenda a utilização de 10 µl de sêmen liquefeito em lâmina de vidro limpa, coberto com lamínula de 22 mm x 22 mm. Deve-se tomar cuidado para que não haja formação de bolhas entre a lâmina e a lamínula (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Com o aumento de 100x, visualizam-se cordões mucosos, agregação ou aglutinação dos espermatozoides e se os espermatozoides estão distribuídos de forma homogênea na preparação. A varredura da lâmina com aumento de 200x a 400x é feita para a avaliação da

motilidade, a avaliação para determinação da diluição necessária para avaliar precisamente o número de espermatozoides e presença de células epiteliais, leucócitos, células imaturas e outras células que não sejam espermatozoides (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 1 - Avaliação inicial microscópica de amostra de sêmen humano, ampliação de 400x



Fonte: Imagem da autora

A homogeneização da amostra de sêmen é importante para que a mesma seja representativa do todo e deve ser realizada antes da coleta de cada alíquota a ser analisada a fim de evitar que haja sedimentação (LAGE, 2013).

5.3.1 Avaliação da diluição apropriada do sêmen humano

A diluição apropriada para contagem dos espermatozoides é estimada no exame microscópico inicial. É utilizada uma quantidade de pelo menos 50 μ l de sêmen adicionada ao diluente; isto garante representatividade confiável e volume de suspensão suficiente para a amostra ser completamente homogeneizada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Tabela 1 - Diluições para a amostra de sêmen humano

Número de espermatozoides visualizados em 400 x	Número de espermatozoides visualizados em 200 x	Diluição	Ejaculado (µl)	Fixador (µl)
> 200	> 800	1:50 (1 + 49)	50	2450
40 - 200	160 – 800	1:20 (1 + 19)	50	950
16 – 40	64 – 160	1:10 (1 + 9)	50	450
2 – 15	8 – 64	1:5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1:2 (1 + 1)	100	100

Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).






5.3.2 Agregados de espermatozoides

A agregação não específica de espermatozoides é resultado da aderência de espermatozoides imóveis entre si ou de espermatozoides móveis aderidos a filamentos de muco, células não espermáticas ou detritos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.3 Aglutinação de espermatozoides

A aglutinação diz respeito a espermatozoides móveis grudados uns aos outros, cabeça a cabeça, cauda a cauda ou de forma mista. Qualquer espermatozoide que esteja unido a outro ou outros deve ter o principal tipo de aglutinação registrado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021), pois isto poderá influenciar negativamente na concentração e motilidade dos espermatozoides (SUNDER; LESLIE, 2022).

Quadro 2 - Esquema representando os graus de aglutinação de espermatozoides

Partes envolvidas	Grau de aglutinação			
	1. Isolado (< 10 espermatozoides por aglutinado, muitos espermatozoides livres)	2. Moderado (10-50 espermatozoides por aglutinado e espermatozoides livres)	3. Alto (aglutinação de > 50 espermatozoides, alguns livres)	4. Muito alto (todos os espermatozoides aglutinados, e aglutinações interligadas)
Cabeça a cabeça				
Cauda a cauda				
Ponta da cauda a ponta da cauda				
Misto (cabeça a cabeça e cauda a cauda)				
Emaranhado (cabeças e caudas emaranhados)				

Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

5.3.4 Motilidade

A investigação da motilidade deve ser avaliada logo após a liquefação do sêmen e dentro de uma hora após a coleta da amostra (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A motilidade dos espermatozoides diminui ao longo do tempo, pois depende da disponibilidade de energia e da presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são

produzidas pelo próprio esperma ou por leucócitos do plasma seminal (BJÖRNDAHL; HAUGEN, 2008). A motilidade diminuída dos espermatozoides é uma alteração frequente em homens com infertilidade (VASQUEZ R; VASQUEZ ECHEVERRI, 2007), pois a taxa de motilidade progressiva dos espermatozoides está relacionada com taxas de gravidez (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Para a leitura microscópica da motilidade, primeiramente avalia-se se os espermatozoides estão bem distribuídos na lâmina, em aumento de 100x e 200x. Em seguida, avalia-se pelo menos 5 campos aleatórios, mesmo que sejam contados mais de 200 espermatozoides em menos de 5 campos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Ao avaliar a motilidade dentro de um campo selecionado, deve-se iniciar pelos espermatozoides de progressão rápida e lenta para não superestimar o número de espermatozoides progressivos. Em seguida, contam-se os espermatozoides não progressivos e imóveis que permanecem dentro do campo escolhido. É importante que a análise seja realizada em duplicata para se fazer a comparação dos resultados; o prosseguimento das demais análises só deve ser feito se a contagem e avaliação da motilidade das replicatas estiverem aceitavelmente próximas, caso contrário, novas amostras devem ser preparadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.4.1 Categorias da motilidade espermática

Há quatro categorias de motilidade dos espermatozoides recomendadas pelo manual de laboratório da OMS para o exame e processamento do sêmen humano de 2021. Elas são:

- Rapidamente progressivo (categoria A): espermatozoides que se movimentam ativamente, linearmente ou em um grande círculo com velocidade de 25 $\mu\text{m/s}$;
- Lentamente progressivo (categoria B): espermatozoides com movimento ativo, linear ou em um grande círculo com velocidade de 5 a < 25 $\mu\text{m/s}$;
- Não progressivo (categoria C): o espermatozoide possui todos os padrões de movimentação ativa da cauda, mas com ausência de progressão. Possui velocidade menor do que 5 $\mu\text{m/s}$;
- Imóvel (categoria D): o espermatozoide não possui movimentos de cauda ativos.

Os resultados da motilidade espermática são calculados pela realização das porcentagens das quatro categorias acima para as duas replicatas da mesma amostra, separadamente. Realizar também as proporções (%) de motilidade progressiva e espermatozoides móveis. Em seguida, deve ser calculada a média das duas replicatas para o grupo dominante encontrado (espermatozoides móveis ou imóveis), calculando também a diferença entre as replicatas para o grupo dominante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A 5ª edição do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) publicada em 2010 divide a motilidade dos espermatozoides em três categorias, enquanto a 6ª edição do manual de 2021 apresenta quatro categorias de motilidade espermática. A 5ª edição apresenta as categorias A e B da 6ª edição como uma única classificação de motilidade progressiva. A justificativa para tal deve-se ao fato da dificuldade dos avaliadores em definir a velocidade da progressão de tais espermatozoides com tanta exatidão sem viés (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

Quadro 3 - Valor de referência para a motilidade dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%

Tipo de motilidade	Valor mínimo
Motilidade total (espermatozoides progressivos + não progressivos)	42% (40 – 43%)
Motilidade progressiva	30% (29 – 31%)
Motilidade não progressiva	1% (1 – 1%)

Fonte: World Health Organization (2021)

Quadro 4 – Valor de referência para espermatozoides imóveis para o quinto percentil com IC 95%

Valor mínimo	20% (19 – 20%)
--------------	----------------

Fonte: World Health Organization (2021)

5.3.5 Vitalidade espermática

A vitalidade espermática é estimada pela integridade da membrana celular dos espermatozoides (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Se houver grande porcentagem de espermatozoides mortos na amostra de sêmen, a causa deve ser investigada, pesquisando se a mesma é devido a anticorpos citotóxicos, infecção (BJÖRNDAHL; HAUGEN, 2008) ou até mesmo a uma patologia no epidídimo (SUNDER; LESLIE, 2022).

O teste para avaliação da vitalidade espermática é dado pela utilização dos corantes eosina-nigrosina. A porcentagem de espermatozoides vivos é identificada pela não penetração da eosina na cabeça dos espermatozoides, pois possuem membrana celular intacta e serão visualizados com cabeça de coloração branca. Já as células mortas possuem a membrana plasmática danificada, permitindo a entrada do corante e serão visualizadas cabeças de coloração vermelha ou rosa. O fundo escuro formado pela nigrosina torna mais fácil a identificação dos espermatozoides fracamente corados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A vitalidade é um teste que deve ser avaliado o mais rapidamente possível após a liquefação do sêmen, de preferência em 30 minutos e no máximo após 1 hora da ejaculação. A lâmina deve ser examinada em microscópio óptico com ampliação de 1000x em óleo de imersão. Avaliar pelo menos 200 espermatozoides, calculando o número de células coradas (mortas) e não coradas (vivas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 2 - Espermatozoide morto à esquerda e espermatozoide vivo à direita, coloração de eosina-nigrosina, ampliação de 1000x



Fonte: Imagem da autora

Quadro 5 - Valor de referência para a vitalidade dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%

Valor mínimo	54% (50 – 56%)
--------------	----------------

Fonte: World Health Organization (2021)

5.3.5.1 Técnica de coloração com eosina-nigrosina

Para a preparação do corante eosina-nigrosina, segue-se os passos:

1. Dissolver 0,67 gramas de eosina Y e 0,90 gramas de cloreto de sódio em 100 ml de água destilada, sob aquecimento suave;
2. Adicionar 10,0 gramas de nigrosina à solução, que deve ser levada até a ebulição e, após este processo, deve ser deixada resfriar em temperatura ambiente;
3. Filtrar a mistura obtida com papel filtro e armazenar em frasco de vidro escuro e selado (MORTIMER *et al.*, 2022).

Para o procedimento de coloração da amostra, mistura-se uma alíquota de 50 µl do sêmen não diluído, liquefeito e bem homogeneizado com 50 µl do corante eosina-nigrosina, incubando por 30 segundos. Coloca-se então de 12 a 15 µl da mistura em lâmina limpa e previamente identificada para realização do esfregaço que deve ser seco ao ar. Após a secagem, as lâminas podem ser examinadas ou montadas permanentemente com lamínula e agente de montagem (MORTIMER *et al.*, 2022).

5.3.6 Contagem de espermatozoides e outras células

O número total de espermatozoides é um valor preditivo da concepção, mas deve ser relacionado com outros resultados reprodutivos. O número de espermatozoides por ejaculação é calculado utilizando a concentração de espermatozoides e o volume do ejaculado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Para a contagem de espermatozoides, a diluição mais apropriada da amostra deve ser escolhida a partir da avaliação a fresco. Uma câmara de contagem deve ser preparada e preenchida com o sêmen diluído e após esse procedimento deve ser colocada em câmara úmida para que os espermatozoides se estabeleçam no fundo da câmara de contagem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

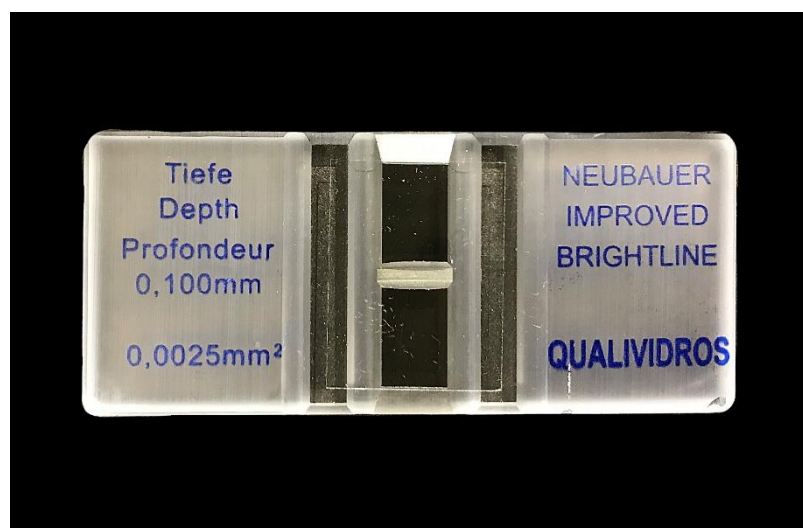
Após a retirada da câmara úmida, a contagem deve ser realizada imediatamente para evitar que a evaporação do líquido interfira nos resultados. As contagens das duas replicatas devem ser comparadas e, se estiverem aceitavelmente próximas, deve-se prosseguir com os cálculos. Caso as contagens sejam distantes entre si, uma nova diluição deve ser preparada. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Somente os espermatozoides inteiros devem ser contabilizados, ou seja, com cabeça e cauda. Células imaturas e leucócitos não devem ser incluídos na contagem de espermatozoides, mas células jovens e células sanguíneas podem ser contadas separadamente se sua presença for significativa (STRASINGER; LORENZO, 2001).

5.3.6.1 Câmara de Neubauer

Usualmente nos laboratórios de análises clínicas, a concentração espermática é dada com a utilização da câmara de Neubauer (STRASINGER; LORENZO, 2001). A câmara de Neubauer possui duas câmaras de contagem separadas e cada uma delas possui padrão microscópico de 3 mm X 3 mm de linhas de grade gravadas em sua superfície de vidro. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 3 - Câmara de Neubauer e lamínula, utilizada para contagem do número de espermatozoides

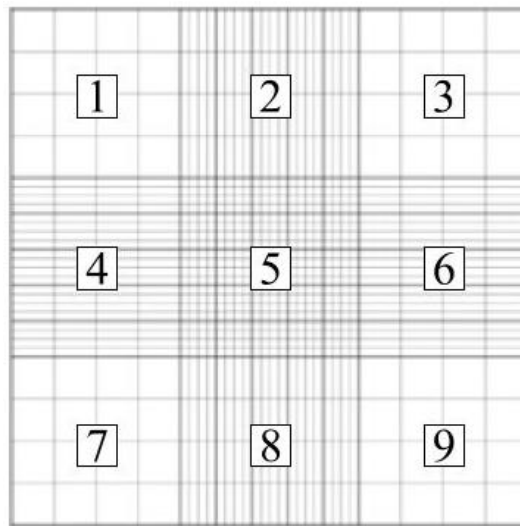


Fonte: Imagem da autora

A câmara de Neubauer tem 1 mm de profundidade e está dividida em 9 grades ou quadrados maiores (LUDWIG; FRICK, 1987). Dentre os 9 quadrados maiores, geralmente

são contados os espermatozoides que estão nos 4 quadrados menores dos cantos e no quadrado menor central do quadrado maior central. Os dois lados da câmara são preenchidos para realizar a contagem em duplicata com a mesma diluição da amostra (STRASINGER; LORENZO, 2001).

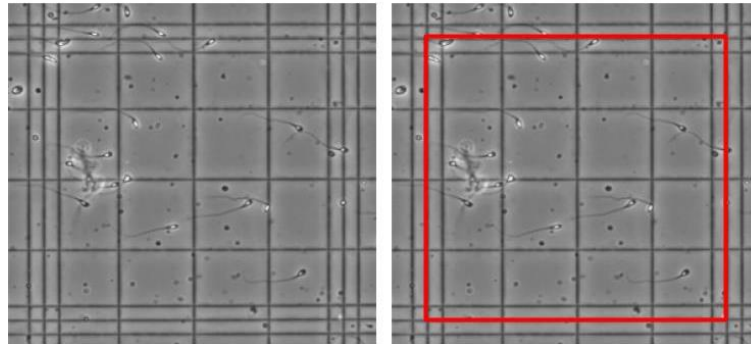
Figura 4 - Áreas de contagem da câmara de Neubauer



Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

O limite de um quadrado menor para contagem dos espermatozoides é a linha do meio das três linhas divisórias. Um espermatozoide é avaliado para a contagem pela localização de sua cabeça; a localização de sua cauda não é importante. Todo espermatozoide dentro do quadrado menor central que tenha sua cabeça na linha central inferior ou da esquerda é contado; se a cabeça está na linha central superior ou da direita, esta célula não será contabilizada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 5 - Limite de contagem para as linhas dos quadrados menores centrais da câmara de Neubauer



Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

A câmara de Neubauer é preparada umedecendo os dois pilares de vidro localizados ao lado da parte central de contagem da câmara, para que a lamínula possa ser pressionada firmemente e fixada nos pilares, assegurando-se que a mesma esteja bem presa e não se moverá com o toque da ponteira da micropipeta. Em seguida, deve-se homogeneizar a amostra diluída e preencher toda a área da câmara que está sob a lamínula, utilizando uma micropipeta, tocando a ponteira da micropipeta contra a borda da lamínula e pressionando o êmbolo lentamente para que a diluição preencha a câmara por capilaridade. Não encher demais ou preencher a câmara insuficientemente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Uma segunda alíquota da diluição da amostra deve ser retirada para o preenchimento do outro lado da câmara de Neubauer. O hemocitômetro deve ser armazenado horizontalmente e em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos em câmara úmida, para que haja a sedimentação completa dos espermatozoides no fundo da câmara de contagem. A câmara úmida compreende uma placa de Petri com um papel filtro saturado com água (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.6.1.1 Avaliação do número de espermatozoides na câmara de Neubauer

A contagem do número de espermatozoides da amostra deve ser realizada nos dois lados da câmara de Neubauer e, se houver concordância dos valores, o resultado é considerado representativo da amostra. O hemocitômetro deve ser avaliado em uma

ampliação de 200x ou 400x, com o objetivo de contar no mínimo 200 espermatozoides em cada lado da câmara (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Primeiramente, deve ser avaliado o quadrado menor localizado no canto superior esquerdo na grade central da câmara de Neubauer. O número encontrado será usado para decidir quantos quadrados da área central serão analisados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

- < 10 espermatozoides → conta-se toda a grade central (25 quadrados menores);
- 10 - 40 espermatozoides → conta-se 10 quadrados menores da grade central;
- > 40 espermatozoides → conta-se 5 quadrados menores da grade central (por exemplo, 4 dos cantos e o central).

Se a diferença entre a contagem das replicatas for muito alta, a câmara deve ser preenchida com nova alíquota e contada novamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.6.1.2 Cálculo da concentração do sêmen a partir da contagem de espermatozoides

A soma das duas replicatas é dividida por um fator determinado pela diluição da amostra e pelo número de quadrados menores contados ou grades avaliadas nos dois lados da câmara de Neubauer, como mostrado na Tabela 2. A concentração é dada na unidade espermatozoides/ml (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Tabela 2 – Valor do fator de correção para cálculo da concentração a partir da contagem de espermatozoides

Diluição	N° de quadrados menores contados			N° de grades contadas								
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Valor do fator de correção											
1:2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900	
1:5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360	
1:10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
1:20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1:50	0,8	1,6	4	8	12	16	20	24	28	32	36	

Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

Quadro 6 - Valor de referência para a concentração de espermatozoides no sêmen humano para o quinto percentil com IC 95%

Valor mínimo	$16 \times 10^6/\text{ml}$ ($15 - 18 \times 10^6/\text{ml}$)
--------------	--

Fonte: World Health Organization (2021)

5.3.6.1.3 Cálculo do número total de espermatozoides

O cálculo do número total de espermatozoides é obtido pela multiplicação da concentração de espermatozoides pelo volume total do ejaculado. O número total de espermatozoides deve ser informado como número inteiro de milhões de espermatozoides, com exceção para valores abaixo de 10 milhões, para o qual se aceita uma casa decimal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Quadro 7 - Valor de referência para o número total de espermatozoides por ejaculado para o quinto percentil com IC 95%

Valor mínimo	$39 \times 10^6/\text{ejaculado}$ ($35 - 40 \times 10^6/\text{ejaculado}$)
--------------	--

Fonte: World Health Organization (2021)

5.3.6.2 Câmara de Makler

A câmara de Makler permite a contagem de espermatozoides a partir de amostras puras de sêmen, ou seja, amostras não diluídas. Esta câmara possui uma grade de 1 mm^2 dividida em 100 quadrados, cada um medindo $0,12 \times 0,1 \text{ mm}^2$, que estão gravados na lamínula. A câmara de Makler também é utilizada para a avaliação da motilidade (STRASINGER; LORENZO, 2001).

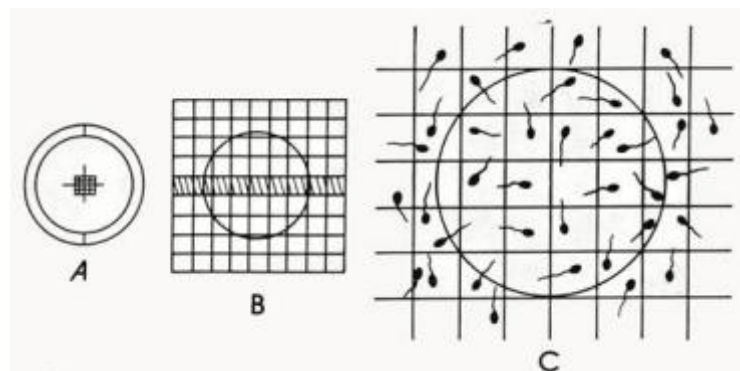
Figura 6 - Câmara de Makler sendo preenchida com gota de amostra de sêmen



Fonte: Imagem da autora

Para o processamento da amostra, uma gota do sêmen homogeneizado e liquefeito é colocada na parte inferior da câmara de Makler e sobre ela coloca-se a lamínula que deve ser pressionada para garantir que a profundidade seja uniforme. Coloca-se a câmara no microscópio e, com a ampliação de 200x, faz-se a contagem de uma tira de 10 quadrados, sendo o volume igual a 10 μl . Por fim, para o cálculo da concentração multiplica-se o número de espermatozoides contados por 1 milhão. Para garantir a confiabilidade dos resultados, deve-se contar o conteúdo de três tiras, cada uma com 10 quadrados, de no mínimo duas amostras (LUDWIG; FRICK, 1987).

Figura 7 - Esquema de visualização da câmara de Makler em microscópio



Fonte: Optisum [s.d.]

5.3.7 Morfologia dos espermatozoides

Em uma amostra habitual de sêmen, a maioria dos espermatozoides não possui morfologia normal (BJÖRNDAHL; HAUGEN, 2008). A relação de formas normais de espermatozoides é útil para avaliação de parâmetros de fertilidade, como tempo até a gravidez, taxas de gravidez *in vivo* e *in vitro* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). As alterações anormais encontradas na morfologia da cabeça do espermatozoide estão associadas à penetração prejudicada do óvulo, enquanto as anormalidades de cauda irão afetar a motilidade dos espermatozoides (STRASINGER; LORENZO, 2001).

A avaliação prática da morfologia espermática compreende a preparação de um esfregaço de sêmen em lâmina de vidro, sua secagem, fixação e coloração, seguida da colocação de lamínula (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A aparência ideal da cabeça do espermatozoide deve ser lisa, com contorno regular e com formato oval. A região acrossômica deve compreender de 40% a 70% da área da cabeça; não deve conter vacúolos grandes e não mais do que dois vacúolos pequenos que não devem ocupar mais de um quinto da cabeça do espermatozoide. A região pós-acrossomal da cabeça não deve conter vacúolos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A peça intermediária deve ser regular e ter aproximadamente o mesmo comprimento da cabeça do espermatozoide. Além disso, o eixo da peça intermediária deve estar alinhado com o eixo da cabeça da célula (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A morfologia normal da cauda do espermatozoide deve ter o calibre da peça principal uniforme ao longo do comprimento. Deve também ser mais fina que a peça intermediária e ter um comprimento aproximado de 45 μm , cerca de 10 vezes o comprimento da cabeça. A cauda pode estar enrolada ao redor dela mesma, porém não deve ter angulação aguda indicativa de o flagelo estar quebrado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Em conjunto com a avaliação da morfologia dos espermatozoides, pode ser realizada a diferenciação e enumeração de células imaturas e leucócitos. Estas células são contadas a partir de quantas delas são visualizadas com a contagem de 100 espermatozoides maduros (STRASINGER; LORENZO, 2001).

Já a quinta edição do manual da OMS para o exame e processamento do sêmen humano informa que a concentração de outras células (compreendendo células imaturas,

células epiteliais e leucócitos) pode ser calculada pelo número de células contadas em 400 espermatozoides observados. O cálculo é dado por $C = S \times (N/400)$, onde C é a concentração de outras células (10^6 por ml), S é a concentração de espermatozoides (10^6 por ml) e N é o número destas outras células observadas. Se menos de 25 células forem contadas em 400 espermatozoides observados, no laudo deve constar que as células são muito poucas para uma determinação precisa de sua concentração (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

5.3.7.1 Avaliação microscópica da morfologia espermática

Não é necessária a distinção de todas as variações de tamanho e forma da cabeça do espermatozoide ou de todos os defeitos da peça intermediária e da peça principal da cauda. Todos os espermatozoides de cada campo escolhido devem ser avaliados. Analisar somente os espermatozoides intactos, ou seja, com cabeça e cauda. Campos com espermatozoides sobrepostos não devem ser avaliados. A lâmina deve ser visualizada em microscópio com ampliação de 1000x em óleo de imersão e aproximadamente 200 espermatozoides devem ser avaliados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.7.2 Categorias de anormalidade espermática

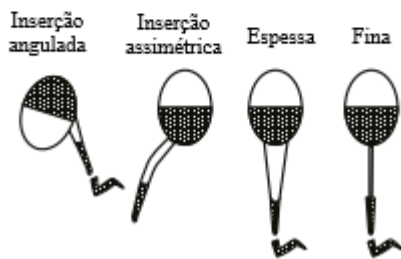
As categorias ou regiões de interesse para contabilizar anormalidades espermáticas são quatro: cabeça, pescoço e peça intermediária, cauda e excesso residual de citoplasma (Figura 8). Um contador de laboratório pode ser utilizado para facilitar a contagem, sendo um botão utilizado para contabilizar os espermatozoides normais, um para espermatozoides anormais e quatro botões para as quatro categorias de anormalidades espermáticas encontradas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 8 - Categorias de anormalidade espermática com exemplos de alterações

1. Anormalidades de cabeça



2. Anormalidades de peça intermediária



3. Anormalidades de cauda



4. Excesso residual de citoplasma



Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

As anormalidades encontradas na cabeça do espermatozoide que podem ser registradas no laudo são: cabeça alongada; piriforme; triangular; redonda sem acrosso; redonda pequena; amorfa; assimétrica; vacuolizada; cabeça dupla; macrocefálica; microcefálica; pequena área acrossômica (< 40% da área normal da cabeça); grande área acrossômica (> 70% da área normal da cabeça) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

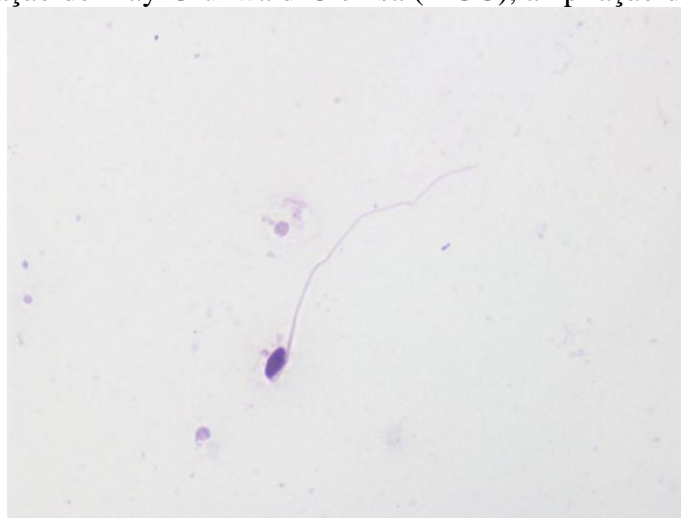
Figura 9 - Anormalidade de cabeça: amorfa; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x



Fonte: Imagem da autora

Para a região da peça intermediária, as seguintes morfologias são consideradas anormais e podem ser registradas: inserção angulada da cabeça (dobrada); inserção acentuadamente angulada; inserção assimétrica da cabeça; peça intermediária irregular; peça intermediária espessa; peça intermediária fina. Quando houver excesso residual de citoplasma, deve-se anotar no laudo quando este excesso for maior que 1/3 da cabeça (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 10 - Anormalidade de peça intermediária: inserção acentuadamente angulada; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x



Fonte: Imagem da autora

Anormalidades da cauda do espermatozoide que poderão ser registradas são: cauda curta ou quebrada; dobrada; enrolada; com largura irregular; caudas curvadas com ângulo acentuado; cauda dupla; caudas múltiplas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 11 - Anormalidade de cauda: dupla; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x



Fonte: Imagem da autora

A partir da avaliação de 200 espermatozoides, são obtidas as porcentagens de espermatozoides normais e anormais, cuja soma deve ser de 100%. Também se obtém a porcentagem de cada tipo de anormalidade espermática encontrada; para isto divide-se o número total de espermatozoides com anormalidade para cada categoria pelo número total de espermatozoides anormais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Defeitos específicos dos espermatozoides como cabeças livres, cabeças de alfinete (caudas livres), cabeças sem acrossomo, células germinativas imaturas e células não espermáticas devem ter sua presença relatada. Se muitos defeitos específicos e células imaturas e germinativas forem encontrados, deve-se relatar também sua prevalência relativa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Quadro 8 - Valor de referência para formas normais dos espermatozoides para o quinto percentil com IC 95%

Valor mínimo	4% (3,9 – 4,0%)
--------------	-----------------

Fonte: World Health Organization (2021)

5.3.8 Preparação de esfregaços de sêmen

Para a análise morfológica do sêmen humano, preparam-se esfregaços que são secos ao ar antes de serem fixados e corados. Para a realização do esfregaço de sêmen, as superfícies das lâminas devem ser limpas esfregando vigorosamente papel de seda ou limpando com etanol; identifica-se a porção fosca da lâmina, certificando-se que a marcação não será removida ou se tornar ilegível pela fixação ou coloração; homogeneizar a amostra de sêmen e aplicar uma alíquota de 5 a 10 µl de sêmen no final da lâmina. Utilizar uma segunda lâmina para arrastar a gota de sêmen ao longo da superfície da lâmina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

É indicado iniciar o esfregaço com volume de 10 µl, utilizando ângulo de 45° e o esfregaço tenha a duração de cerca de 1 segundo. Esta indicação pode variar dependendo das características individuais de cada amostra a ser analisada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

5.3.9 Coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Após a secagem dos esfregaços de sêmen, eles devem ser fixados e corados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Para a coloração de May-Grünwald-Giemsa dois corantes são utilizados, o corante de May-Grünwald e o corante Giemsa (AMER *et al.*, 2001).

Para a preparação da solução estoque de May-Grünwald, seguir os seguintes passos:

1. 0,3 gramas do corante em pó devem ser misturadas e trituradas em 100 ml de metanol utilizando um pilão e almofariz;
2. Filtrar a solução após 2 ou 3 dias (AMER *et al.*, 2001).

Para a preparação da solução estoque de Giemsa, seguir os seguintes passos:

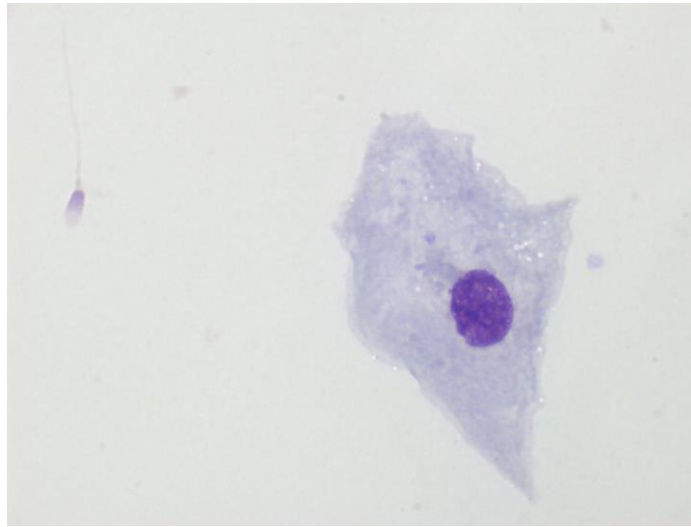
1. Dissolver 0,6 gramas do corante em pó em 50 ml de metanol;
2. Adicionar 25 ml de glicerina em seguida;
3. Filtrar após 2 ou 3 dias (AMER *et al.*, 2001).

Para o procedimento de coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), primeiramente deve-se fixar a lâmina com o esfregaço já seco mergulhando-a em metanol por 5 a 10 minutos. O metanol é o fixador de escolha, mas o álcool etílico também pode ser utilizado para esse fim. Após a fixação, as lâminas devem ser mergulhadas em frasco contendo a solução de May-Grünwald recém-diluída com um volume igual de água tamponada. Após 15 minutos mergulhadas em solução de May-Grünwald diluído, as lâminas devem ser transferidas sem lavar para um frasco contendo a solução Giemsa recém diluída 1:10 com água tamponada (pH 6,8), sendo 1 parte de Giemsa para 9 partes da água (BAIN, 2017).

As lâminas devem permanecer no frasco com Giemsa por 10 a 15 minutos e, após esse procedimento, devem ser transferidas para um frasco contendo água tamponada com pH 6,8, lavando rapidamente os esfregaços com três ou quatro trocas de água para que, na última troca, as lâminas sejam deixadas de 2 a 5 minutos em água tamponada. É importante que os esfregaços sejam transferidos de um corante para outro sem secar entre as trocas de frascos (BAIN, 2017). Se a coloração com MGG for bem-sucedida, os núcleos das células devem estar corados de roxo, vermelho e rosa (PIATON *et al.*, 2015).

A coloração de May-Grünwald-Giemsa é ótima para corar e diferenciar as células redondas (termo utilizado para denominar outras células encontradas no esfregaço de sêmen) além dos espermatozoides, como células imaturas, leucócitos, células epiteliais e formas degenerativas (LUDWIG; FRICK, 1987).

Figura 12 - Espermatozoide e célula epitelial; coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), ampliação de 1000x



Fonte: Imagem da autora

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho aborda a realização do espermograma, cujos resultados são muito importantes para avaliação da infertilidade masculina, juntamente com a investigação médica e clínica de cada paciente. Toda análise de amostras de sêmen humano, seja ela macroscópica ou microscópica, possui resultados que devem ser comparados com valores de referência validados e estabelecidos mundialmente para a população masculina pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

A elaboração do material didático sobre a análise de sêmen humano contou com a junção de conhecimentos teóricos e práticos no formato de texto e de figuras, com a descrição das análises macroscópicas e microscópicas realizadas no espermograma. A realização do espermograma por alunos e profissionais da área pode ser facilitada com a consulta do presente material didático. As informações contidas no material descritivo são de grande auxílio para compreensão e seguimento dos exames, servindo como um guia teórico-prático para execução da análise do sêmen humano.

REFERÊNCIAS

- AMER, Medhat *et al.* May-Grunwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. **Human Reproduction**, [S.l.], v. 16, n. 7, p. 1427-1432, jul. 2001. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/16.7.1427>.
- ARRUDA, Alcínia Braga de Lima *et al.* A importância do material educativo no aprendizado dos alunos da disciplina de hematologia. In: VIEIRA, Silvana Lima (org.). **Educação, Trabalho e Gestão na Saúde: reflexões, reflexos e ações**. [S.l.]: Editora Científica Digital, 2021. p. 329-343. DOI: <http://dx.doi.org/10.37885/210805714>.
- AUGER, Jacques *et al.* Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. **New England Journal of Medicine**, [S.l.], v. 332, n. 5, p. 281-285, fev. 1995. Massachusetts Medical Society. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199502023320501>.
- BAIN, Barbara J. Preparation and Staining Methods for Blood and Bone Marrow Films. In: BAIN, Barbara J.; BATES, Imelda; LAFFAN, Michael A. **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12. ed. Londres: Elsevier, 2017. Cap. 4. p. 50-60.
- BENTO, Dalvaci. **A produção do material didático para EaD**. São Paulo: Cengage, 2017.
- BJÖRNDAHL, Lars; HAUGEN, Trine B. Hva forteller en saedanlyse? [The information contained in a semen analysis]. **Journal of the Norwegian Medical Association**, Noruega, v. 128, n. 3, p. 320-3, jan. 2008.
- BJÖRNDAHL, L; KVIST, U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. **Reprod Biomed Online**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 440-448, jul. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61888-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61888-3).
- BORDINHÃO, J. P; SILVA, E. N. O uso dos materiais didáticos como instrumentos estratégicos ao ensino-aprendizagem. **Revista Científica Semana Acadêmica**, Fortaleza, Nº 000073, out. 2015.
- CAMPBELL, Martin J. *et al.* Distribution of semen examination results 2020 – A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. **Wiley Online Library**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 817-822, fev. 2021. Andrology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12983>.
- DURAIRAJANAYAGAM, Damayanthi. Lifestyle causes of male infertility. **Arab Journal of Urology**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 10-20, mar. 2018. Informa UK Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.004>.
- FONSECA, Ana *et al.* Male Reproductive Health - study of a sperm donor population. **Jbra Assisted Reproduction**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 247-254, jun. 2021. GN1 Sistemas e Publicações Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1518-0557.20210064>.
- FRANKEN, D.R; OEHNINGER, S. Semen analysis and sperm function testing. **Asian Journal of Andrology**. [S.l.], v. 14, n. 1, p. 6-13, jan. 2012. DOI:10.1038/aja.2011.58.

FREITAS, N. K.; RODRIGUES, M. H. O livro didático ao longo do tempo: a forma do conteúdo. **DAPesquisa**, Florianópolis, v. 3, n. 5, p. 300-307, 2008. DOI: 10.5965/1808312903052008300.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Brasil: Elsevier, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, Texto e Atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2017.

LAGE, Ivi Cristina Rubim Duarte. **Análise seminal**: variabilidade da concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides com o emprego da metodologia preconizada pela organização mundial da saúde. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/30609/R%20-%20D%20-%20IVI%20CRISTINA%20RUBIM%20DUARTE%20LAGE.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 maio 2022.

LUDWIG, G.; FRICK, J. **Spermatology**: atlas and manual. Londres: Springer-Verlag, 1987.

MATOS, Carolina Xavier de; SILVA, Martha Holanda da; VICENTE, Kyldes Batista. Prática docente e materiais didáticos na sala de aula. **Revista Panorâmica**, [S.l.], v. 33, p. 313-337, maio/ago. 2021.

MOORE, K. L; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MORTIMER, David *et al.* **A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2022.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento do sêmen humano**. 5. ed. [S.l.]: World Health Organization, 2010. 277 p. Tradução de: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 2018. Disponível em: https://pncq.org.br/uploads/pdfs/manual_laboratorio_oms_A5_web.pdf. Acesso em: maio/jun., 2022.

OPTISUM. **Camara Makler Sefi: Manual de operaciones**. [S.l.]. [s.d.]. 7 p. Disponível em: <https://desego.com/wp-content/uploads/2014/06/Camara-Makler-manual-deusuario.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2022.

OSHIO, S. *et al.* Effect of Sample Collection Site on Semen Parameters of Healthy Young Volunteers. **Archives of Andrology**, [S.l.], v. 53, n. 2, p. 53-58, jan. 2007. Informa UK Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01485010600908454>.

PAPARELLA, Cecilia *et al.* Infertilidad masculina. Exposición laboral a factores ambientales y su efecto sobre la calidad seminal. **Rev. Urug. Med. Int.**, Montevideu, v. 2, n. 2, p. 10-21, ago. 2017.

PIATON, Eric *et al.* Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa: revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. **Annales de Pathologie**, [S.l.], v. 35, n. 4, p. 294-305, ago. 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annpat.2015.05.019>.

SHARLIP, Ira D. et al. Best practice policies for male infertility. **Fertility and Sterility**, [S.L.], v. 77, n. 5, p. 873-882, mai. 2002. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03105-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03105-9).

SILVA, K. C. N. R.; VICTER, E. F. O uso de materiais didáticos no processo de ensino-aprendizagem. In: ENCONTRO NACIONAL DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 12., 2016, São Paulo, SP. **Educação Matemática na Contemporaneidade: desafios e possibilidades**. Disponível em: http://www.sbembrasil.org.br/enem2016/anais/pdf/7617_3455_ID.pdf. Acesso em: maio 2022.

STRASINGER, S. K.; LORENZO, M. S. **Urinalysis and body fluids**. 4. ed. Filadélfia: F. A. Davis Company, 2001.

SUNDER, M.; LESLIE, S.W. Semen Analysis. In: StatPearls [Internet]. **StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL), 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564369/>. Acesso em: 7 jul. 2022.

VASQUEZ R, Fernando; VASQUEZ ECHEVERRI, Daniel. Espermograma y su utilidad clínica. **Revista Salud Uninorte**, Barranquilla, v. 23, n. 2, p. 220-230, out. 2007.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6. ed. Switzerland: WHO press, 2021. 292 p.