



ESPERMOGRAMA

Ane Francyne Costa



Ane Francyne Costa

Farmacêutica

Mestre em Farmácia

Doutora em Ciências Médicas





Tópicos

Infertilidade

Espermograma

-
- Exame macroscópico
 - Exame microscópico
-

Manual da OMS para análise do sêmen

Controle de qualidade no espermograma

Infertilidade



Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade é definida como a incapacidade de conceber após 12 meses ou mais de relações sexuais vaginais regulares sem o uso de contraceptivos

91,2 milhões de pessoas com idades entre 15 e 49 anos vivem com infertilidade em todo o mundo



CONTRIBUIÇÃO PARA INFERTILIDADE

Pode ocorrer devido a fatores masculinos, fatores femininos ou uma combinação dos dois fatores

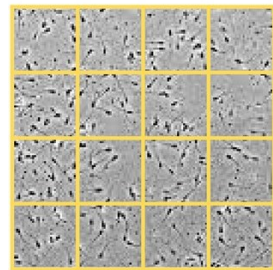


Infertilidade masculina

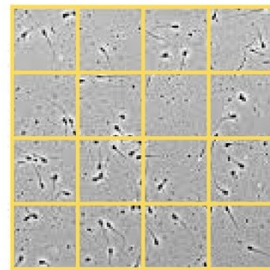
Existe uma preocupação crescente de que a qualidade do sêmen humano está em declínio



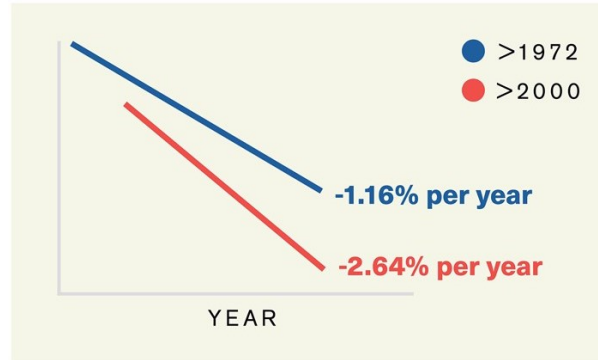
A contagem de espermatozoides está diminuindo em ritmo acelerado em **todo o mundo**



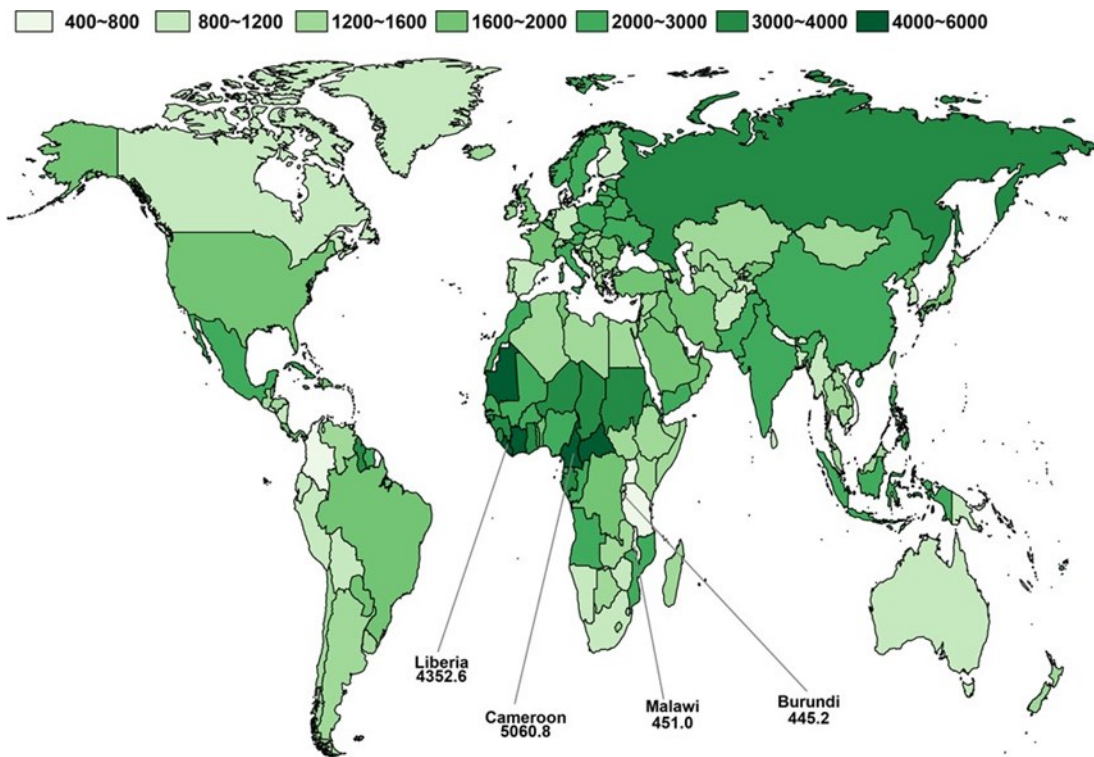
101 mill/ml
(1973)



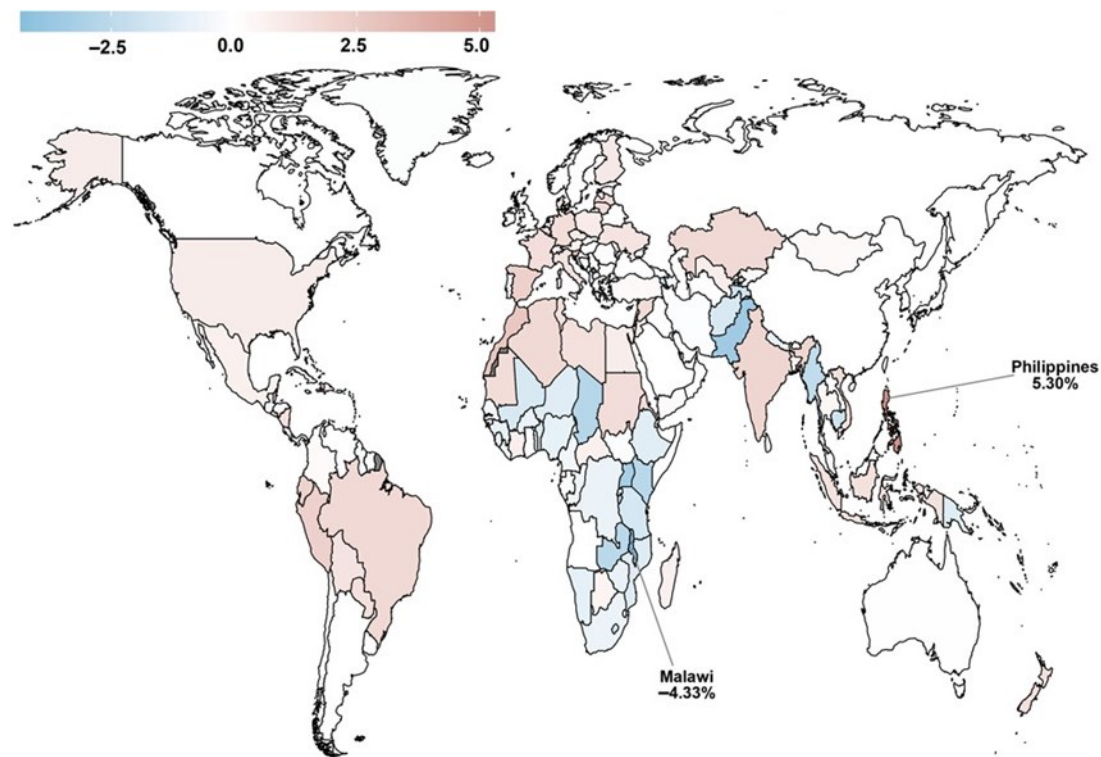
49 mill/ml
(2018)



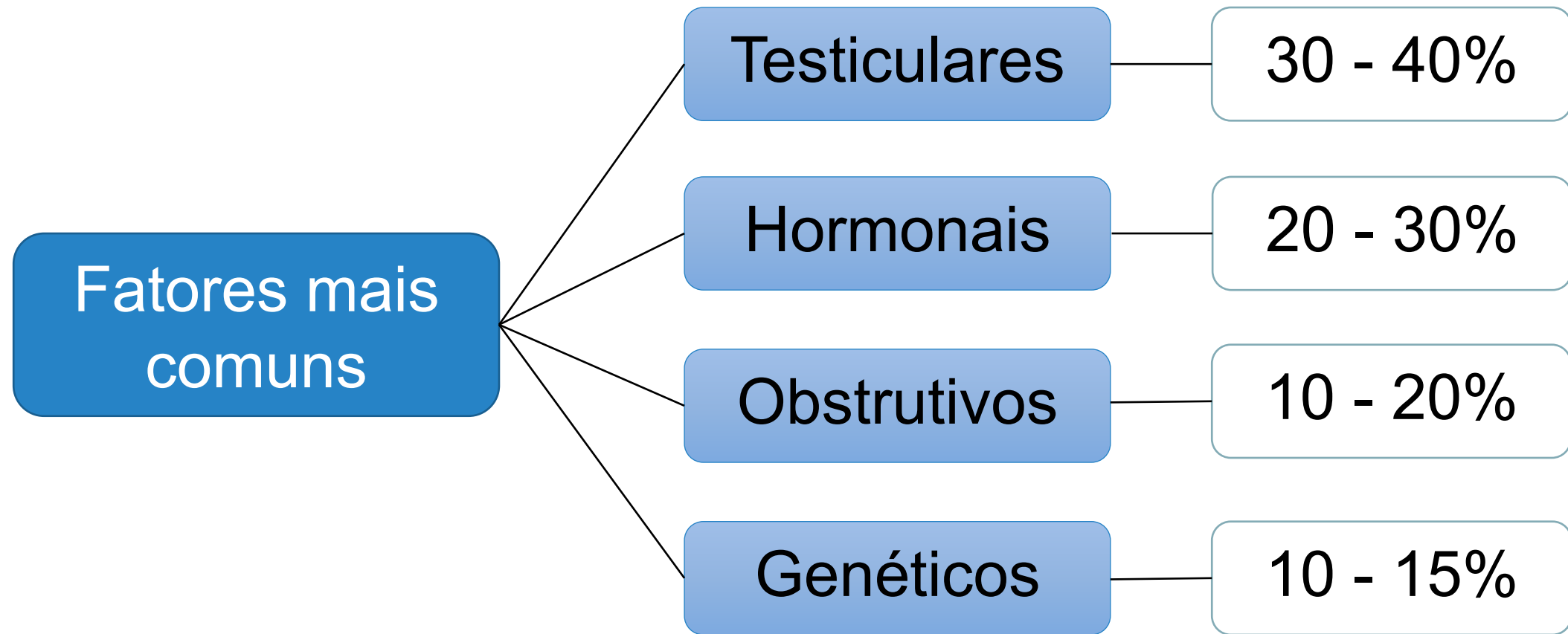
Taxa de prevalência de infertilidade masculina padronizada por idade por 100.000 habitantes, 2021



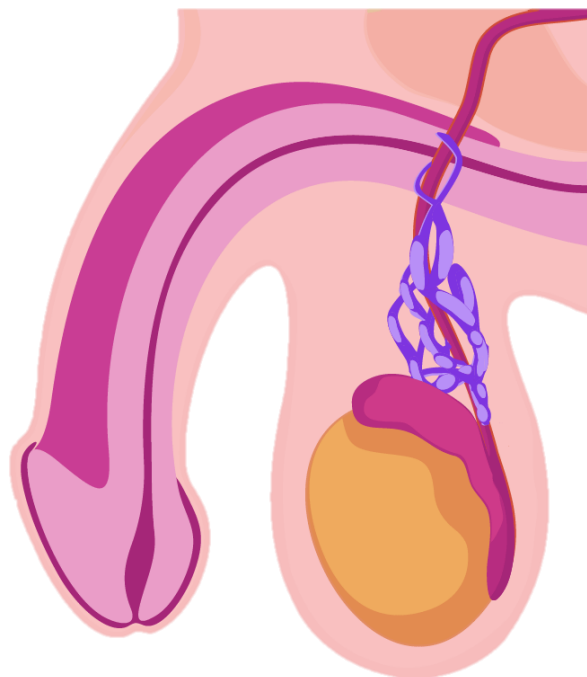
Variação percentual anual estimada na taxa de prevalência de infertilidade masculina, 1990-2021



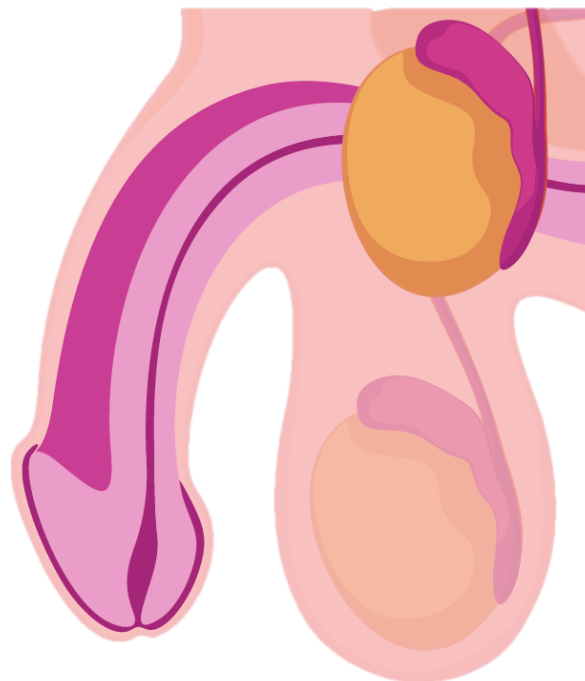
Causas de infertilidade masculina



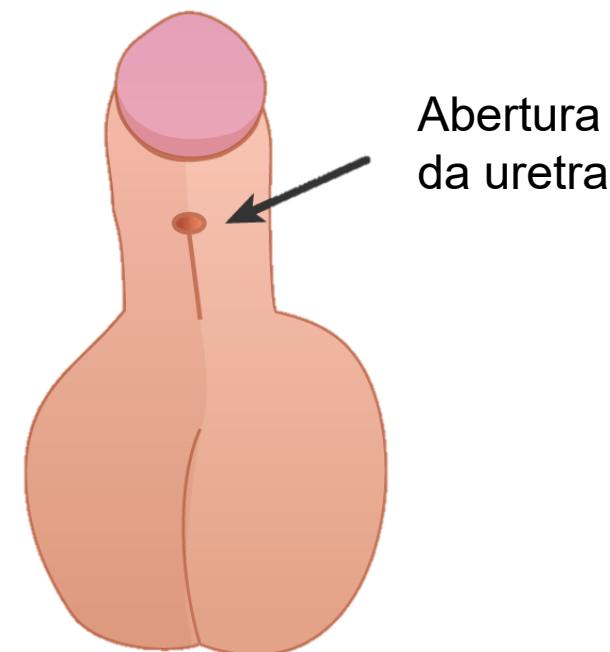
Fatores testiculares



Varicocele



Criptorquidia



Hipospádia

Imagens: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Fatores hormonais

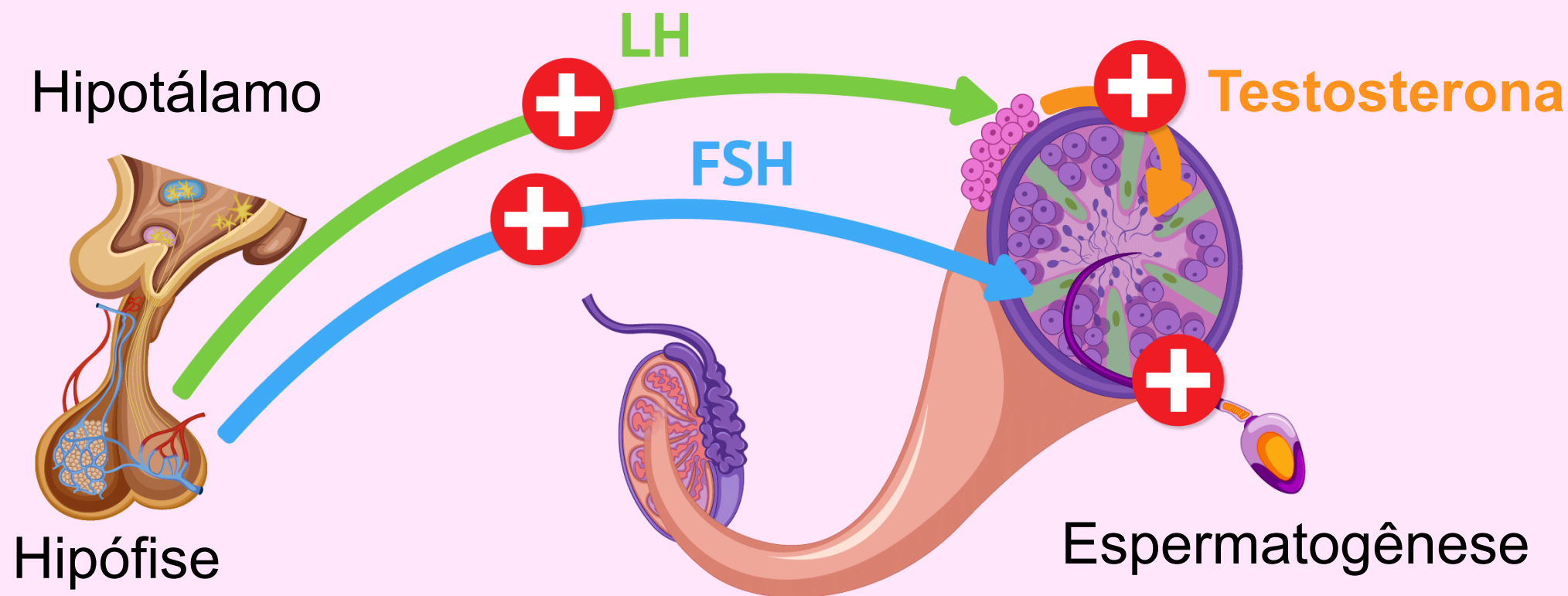
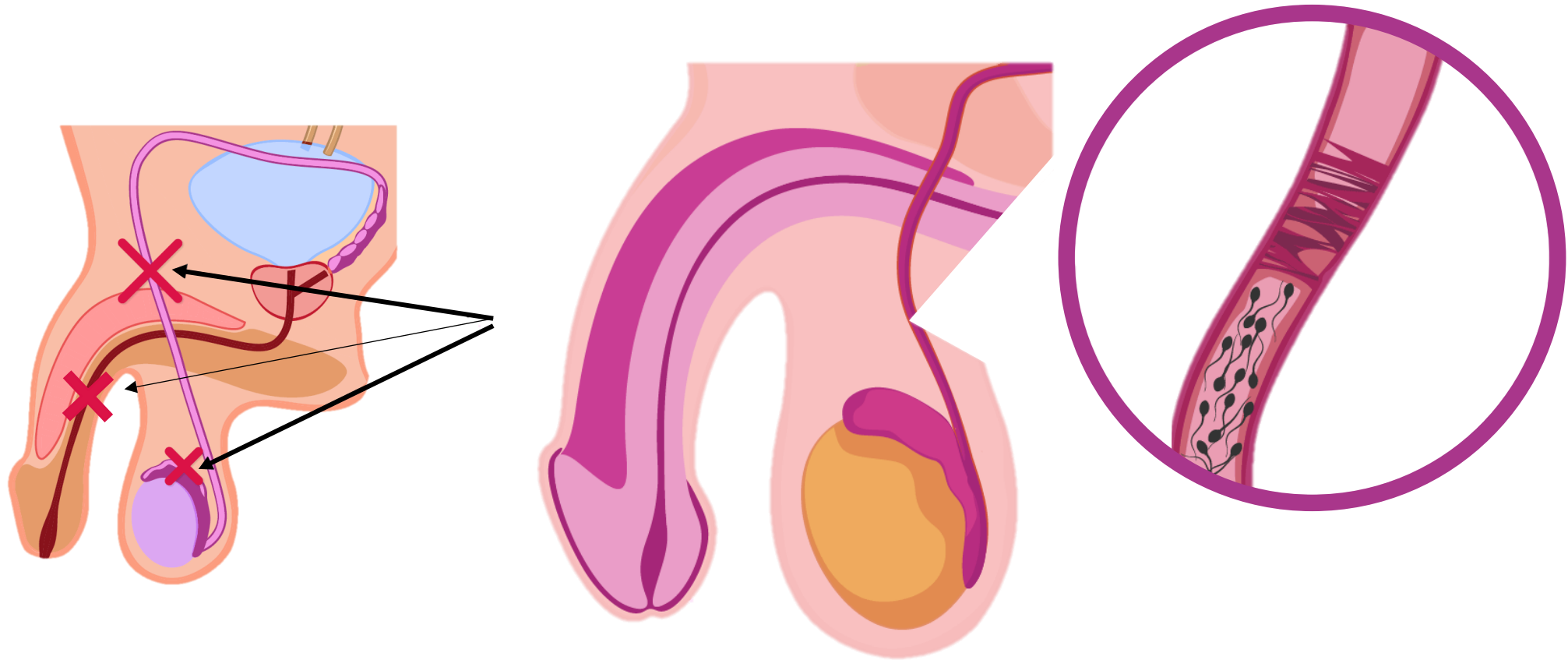


Imagem: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

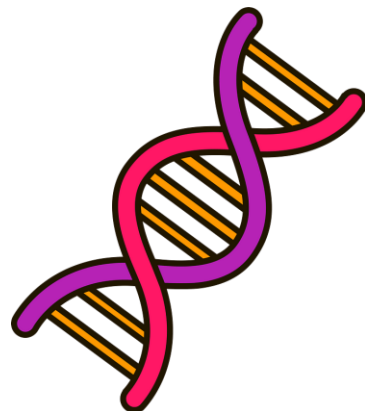
Fatores obstrutivos



Imagens: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Katz; Teloken; Shoshany, 2017

Fatores genéticos



- Anomalias cromossômicas → Síndrome de Klinefelter (47,XXY)
- Microdeleções do cromossomo Y
- Fibrose cística
- Mutação no gene do receptor de andrógeno

Fatores de risco idiopáticos (1/3 dos casos)



Pesticida



Calor excessivo



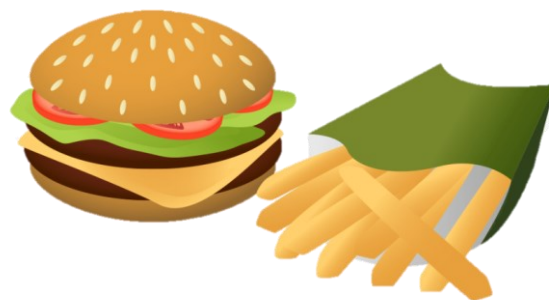
Álcool



Fumo



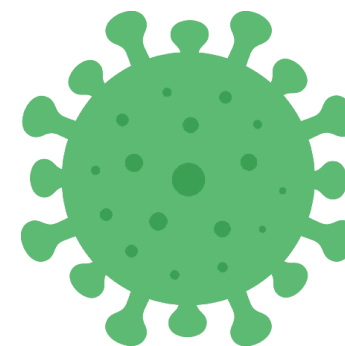
Celular



Gordura saturada



Estresse



Infecção

Espermograma



Análise de sêmen

- Indicada em casos de infertilidade conjugal
- Avaliação e controle do paciente vasectomizado
- Avaliação de doenças testiculares e penianas sobre a espermatogênese
- Investigações médico-legais

- **Sêmen normal** → mistura de espermatozoides e secreções provenientes dos testículos e epidídimos, os quais são misturadas durante a ejaculação com secreções oriundas da próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais
- **Composição final** → líquido viscoso que forma o ejaculado

Coleta do Material e Preparação do Paciente

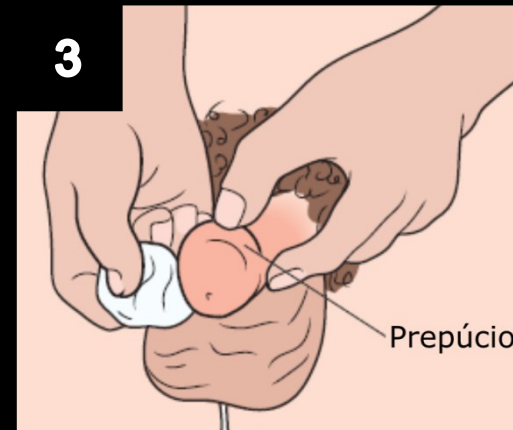
- Amostra deve ser coletada após um período de abstinência sexual de 2 a 7 dias
 - Se abstinência sexual for superior a 7 dias → aumenta número de formas imaturas, de espermatozoides mortos e volume do sêmen
 - Se abstinência sexual for inferior a 2 dias → diminui volume do sêmen e número de espermatozoides



1
Urinar antes da coleta



2
Higienizar **MÃOS** e **PÊNIS** com água e sabonete



3
Secar com papel toalha



4
NÃO utilizar lubrificante ou preservativo



5
Coletar por masturbação **SEM** perda de material



6
Entregar o frasco no laboratório em até 1 hora

Exame Macroscópico

- Tempo de liquefação
- Aspecto
- Volume
- Cor
- Viscosidade
- pH

Tempo de liquefação e aspecto

- Imediatamente após ejaculação, o sêmen forma um coágulo gelatinoso e espesso, adquirindo aspecto heterogêneo, formando coágulos para proteger espermatozoides do contato com pH vaginal (3 a 6)
- Essa coagulação é resultado da interação de proteínas secretadas principalmente pelas vesículas seminais. As principais proteínas envolvidas são as seminogelinas I e II

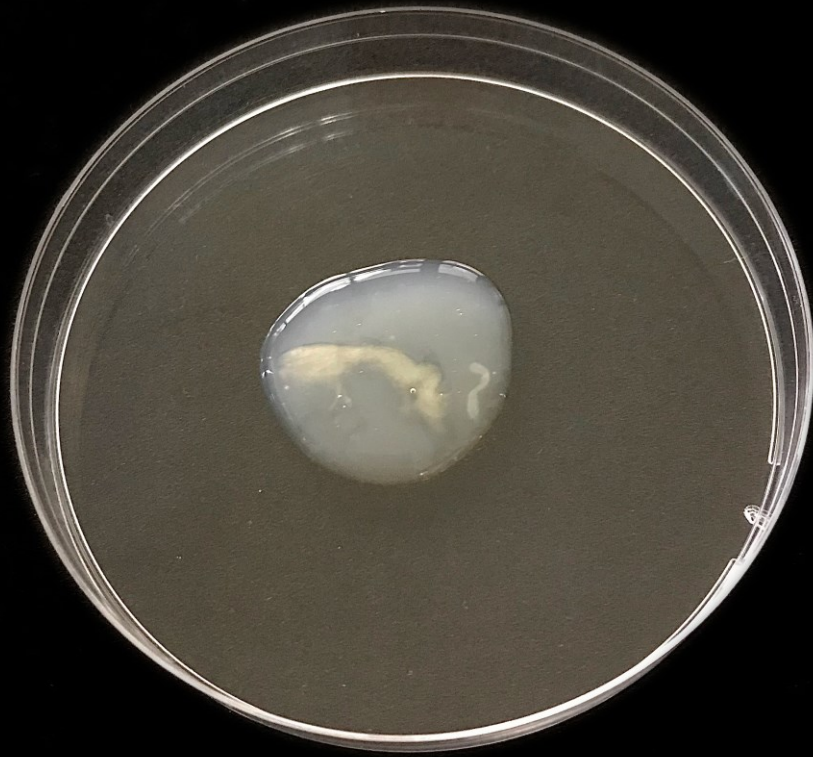
Tempo de liquefação e aspecto

- Liquefação é o processo natural em que o coágulo gelatinoso se dissolve, transformando o sêmen em um líquido homogêneo e menos viscoso
- O principal objetivo da liquefação é liberar os espermatozoides do coágulo para que eles possam ganhar motilidade total e migrar pelo trato reprodutor feminino em direção ao óvulo
- A liquefação é causada pela ação de enzimas proteolíticas (proteases), cuja protease mais importante neste processo é a calicreína 3 (KLK3), mais conhecida como Antígeno Prostático Específico (PSA)

- Tempo de liquefação ocorre geralmente em menos de 20 minutos em temperatura ambiente
- Prostatite (inflamação da próstata) é a causa mais comum da não liquefação do sêmen, já que a próstata é a fonte da enzima PSA
- Amostra de sêmen deve estar completamente homogênea antes do exame microscópico

- Amostra normal tem aparência homogênea e opalescência acinzentada
- Essa aparência pode ser menos opaca, se a concentração dos espermatozoides for muito baixa

Tempo de liquefação e aspecto



Até 1 hora

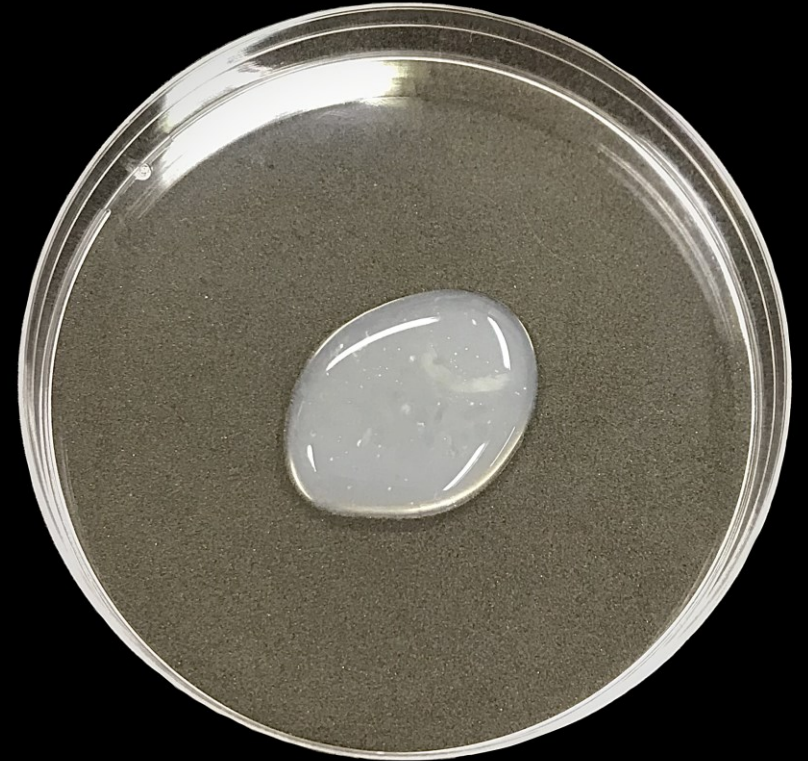


Imagem: LACIT – UFSC

WHO, 2021

- Alterações no tempo de liquefação ou ausência da liquefação devem ser relatadas
- Presença de grumos é sinal de liquefação incompleta, e pode interferir na contagem e motilidade dos espermatozoides
- Amostras seminais normais, podem conter granulações gelatinoides (corpos gelatinosos), os quais não se liquefazem, e aparecem nos períodos de abstinência sexual, devido a diminuição da motilidade dos túbulos seminíferos

- Procedimento:
 - Tempo de liquefação deve ser feito imediatamente após ejaculação cronometrando tempo
 - OMS estabelece que tempo de liquefação deve ser observado em temperatura ambiente até 60 minutos após coleta do sêmen

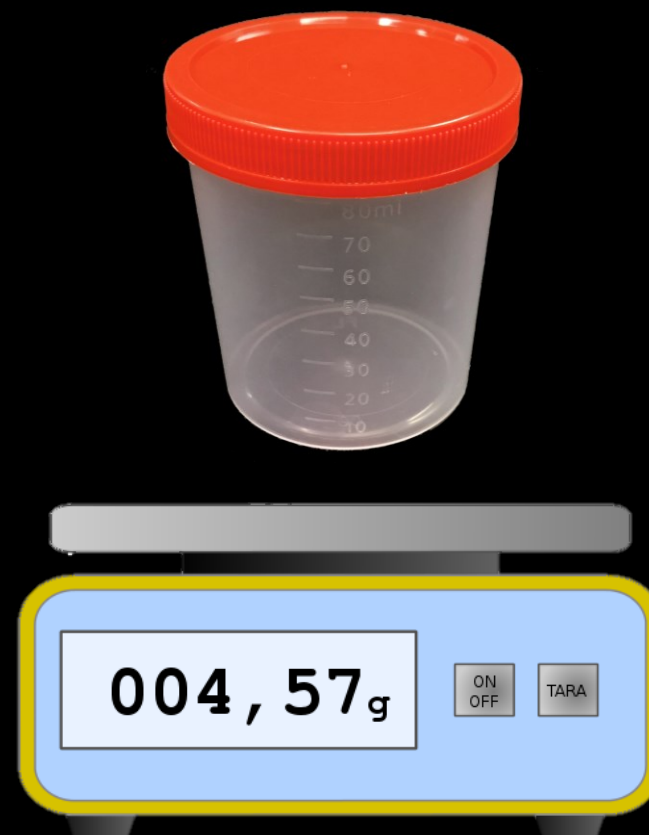
- Procedimento:
 - Ocasionalmente, a amostra pode não liquefazer e nesse caso tratamento adicional é necessário para tornar amostra analisável → deve-se agitar a amostra em Vortéx, até se liquefazer



Volume

- Volume seminal final é diretamente proporcional à quantidade de secreção da próstata e das vesículas seminais, já que volume proveniente dos testículos e epidídimo é reduzido
- Volume varia em um mesmo indivíduo em um curto espaço de tempo, dependendo da frequência de coitos
- **Procedimento:** medir volume com proveta, pipeta graduada ou pesando o frasco

Volume



Pesagem antes e
depois da coleta

Densidade próxima de 1 g/ml

Imagem: LACIT – UFSC

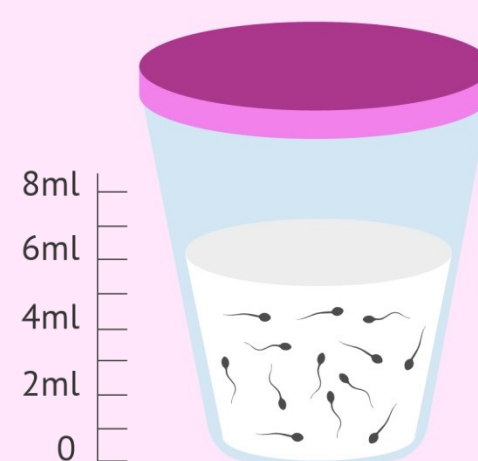
WHO, 2021



Hipospermia
< 1,4ml



Normal
1,4ml a 5ml



Hiperespermia
> 5ml

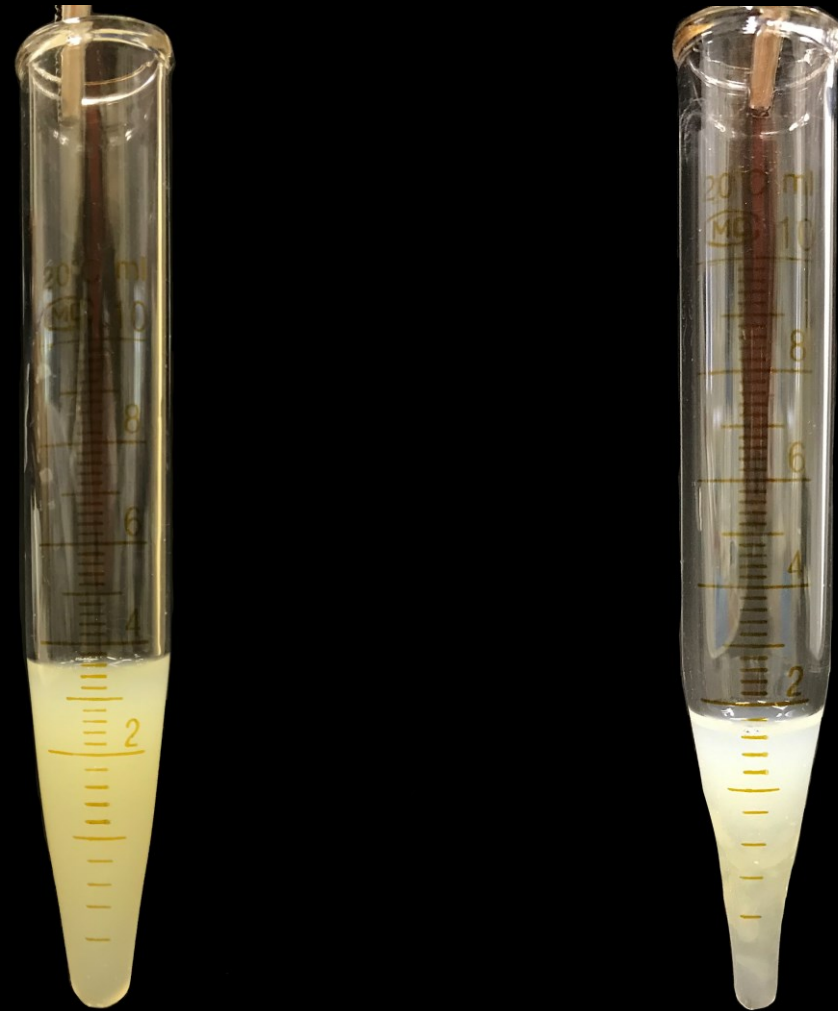
- Volume normal: 1,4ml a 5ml
- Hipospermia: volume menor que 1,4ml
 - Insuficiência ou ausência de abstinência sexual
 - Insuficiência vesicular (Chlamydia ou Mycoplasma)
 - Baixos níveis séricos de testosterona

- Hiperespermia: volume maior que 5,0ml
 - Abstinência sexual prolongada
 - Afecções próstato-vesiculares, principalmente tumores malignos ou benignos
- Aspermia: ausência de ejaculação
 - Agenesias (ausência de um órgão ou tecido)
 - Ejaculação retrógrada
 - Alterações no controle neurológico da ejaculação

Cor

- Normalmente sêmen é branco leitoso, branco opalescente ou levemente acinzentada
- Presença de piócitos em grande quantidade confere ao sêmen cor amarelada, enquanto que presença de hemácias confere cor avermelhada

- Cor normal é branco ou cinza opalescente
- Translúcido (oligozoospermia)
- Vermelho acastanhado (hemospermia)
- Alaranjado (icterícia ou medicamentos)





Branco
opalescente

Amarelo

Âmbar

Vermelho

Castanho

Viscosidade

Normal → Fio até 2 cm

Viscosidade aumentada → Fio superior a 2 cm

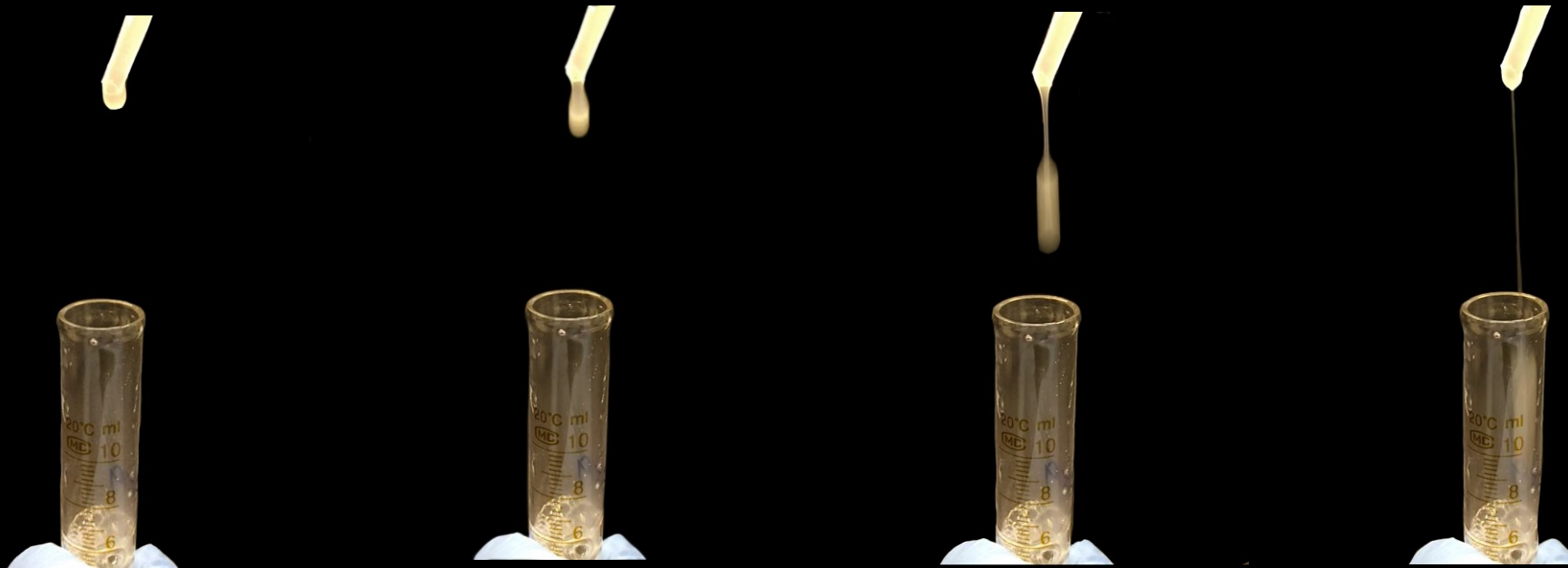


Imagem: LACIT – UFSC

pH

Análise deve ser realizada
depois de 30 minutos após
coleta e não mais que 1 hora

Valor Normal → 7,2 a 8,0

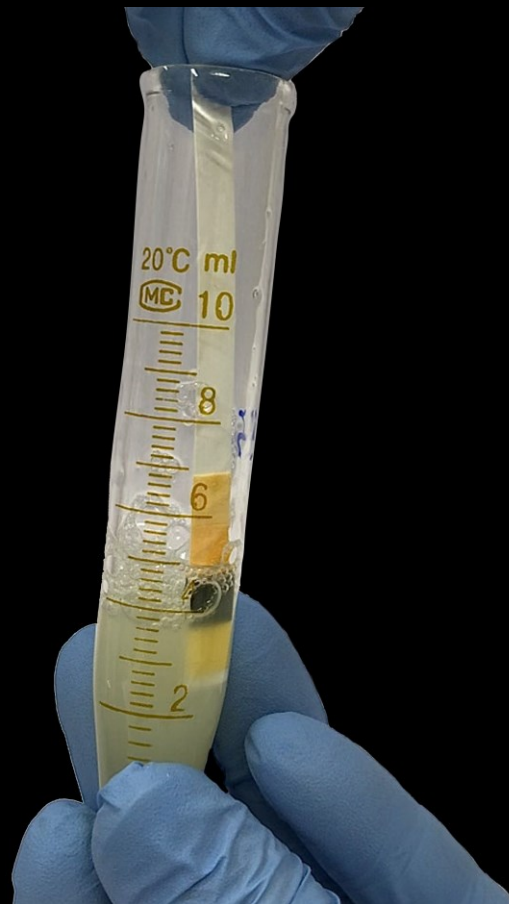


Imagem: LACIT – UFSC

WHO, 2021

- pH do sêmen é alcalino, resultante da somatória do pH alcalino da secreção vesicular e da secreção prostática levemente ácida. Predominância da acidificação ou alcalinização alteram motilidade dos espermatozoides
- Deve-se manter frasco bem fechado, pois em contato com ar, pH tende a elevar-se devido ao desprendimento de CO_2 , pela ação da anidrase carbônica, causando elevação de pH de até 9,0

Exame Microscópico

- Motilidade
- Vitalidade
- Contagem de espermatozoides
- Contagem de células redondas e hemácias
- Morfologia de células germinativas imaturas
- Morfologia dos espermatozoides

Motilidade

- Procedimento:
 - Homogeneizar amostra em temperatura ambiente (20°C a 24°C)
 - Colocar 10µl de sêmen em lâmina de vidro limpa e cobrir com lamínula de 22mm x 22mm
 - Fazer 2 lâminas (fazer média entre lâminas)
 - Procedimento também pode ser feito na câmara de Makler

- Se número de espermatozoides por campo variar consideravelmente → indica que amostra não está homogeneizada
- Se número de espermatozoides for muito pequeno → deve centrifugar amostra
- Avaliação da motilidade, deve ser realizada até 60 minutos após coleta, observando espermatozoides em objetiva de menor aumento, rastreando 4 a 6 campos para avaliar 100 espermatozoides obtendo a porcentagem das categorias classificadas

- A → motilidade progressiva rápida (25 $\mu\text{m/s}$)
- B → motilidade progressiva lenta (de 5 a 25 $\mu\text{m/s}$)
- C → motilidade não progressiva (inferior a 5 $\mu\text{m/s}$)
- D → espermatozoides imóveis

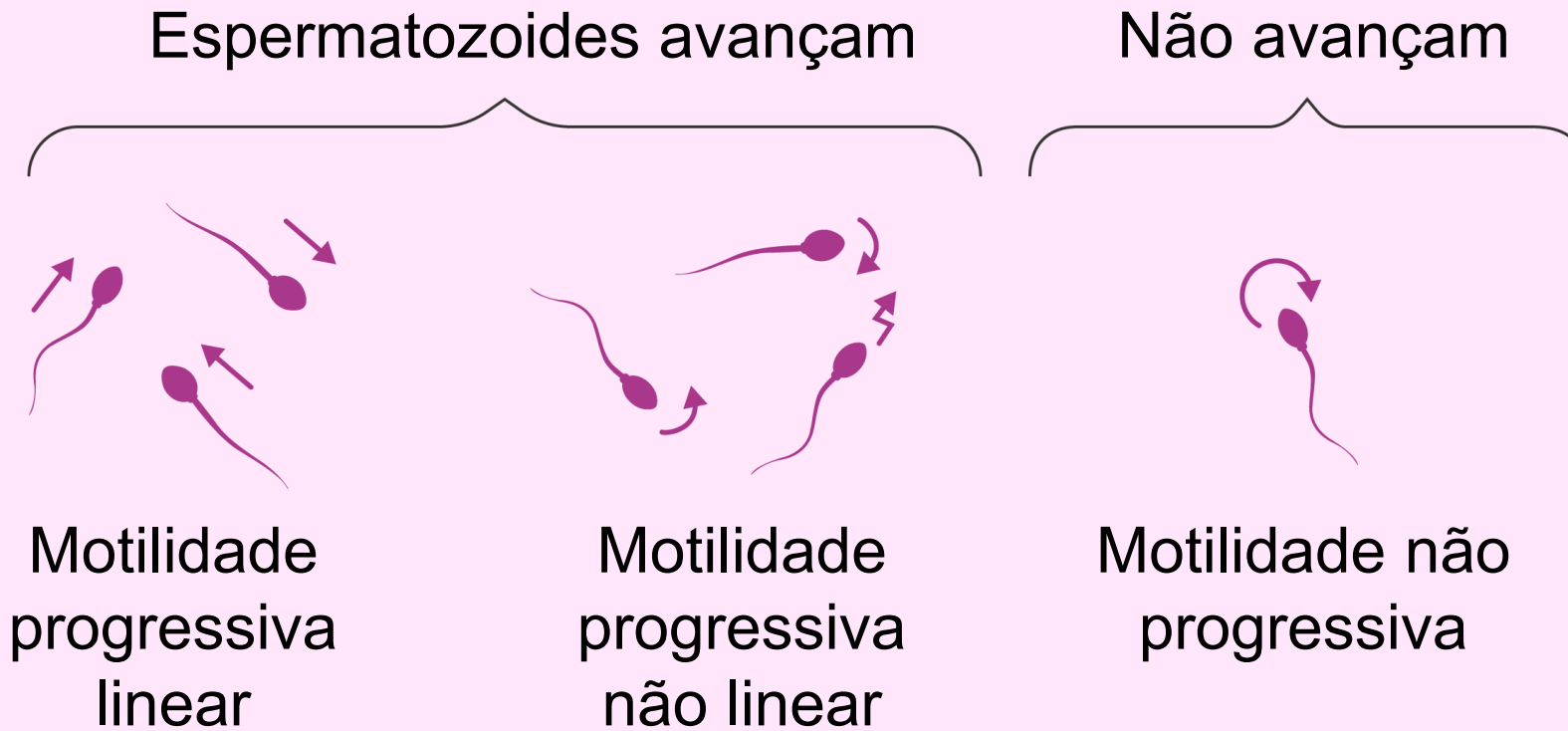


Imagem: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Motilidade

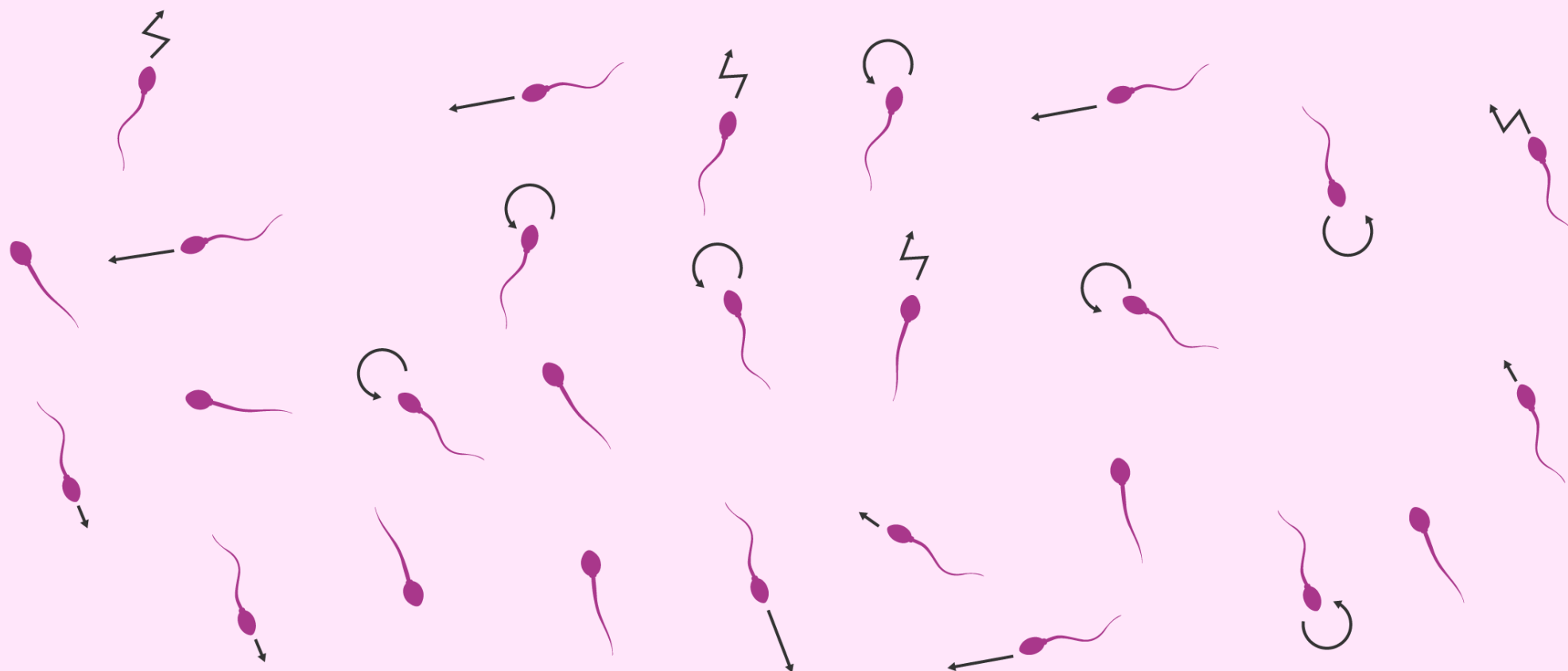


Imagem: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Motilidade progressiva > 30% A+B

- Astenospermia: espermatozoides tem baixa motilidade
- Astenospermia extrínseca: devido aumento da viscosidade
- Astenospermia intrínseca: nível baixo ou ausente de frutose

Vitalidade

- Coloração de eosina passa somente através da membrana plasmática danificada de células mortas
- Em células viáveis a membrana é intacta



Imagem: LACIT –UFSC

Procedimento:

- Misturar uma alíquota de 50 µl de sêmen com um volume igual de suspensão de eosina-nigrosina e aguardar 30 segundos para fazer o esfregaço
- Fazer leitura em imersão, contando 200 espermatozoides
- Espermatozoides vivos não se coram (brancos), enquanto mortos coram-se em rósea
- Resultado → % de espermatozoides vivos

Valor Normal → acima de 54% de espermatozoides vivos

Necropermia → acima de 54% de espermatozoides mortos.
Pode ocorrer na deficiência de frutose

Observação: neste esfregaço corado pela eosina-nigrosina é possível analisar morfologia dos espermatozoides vivos

Concentração

Câmara de Neubauer

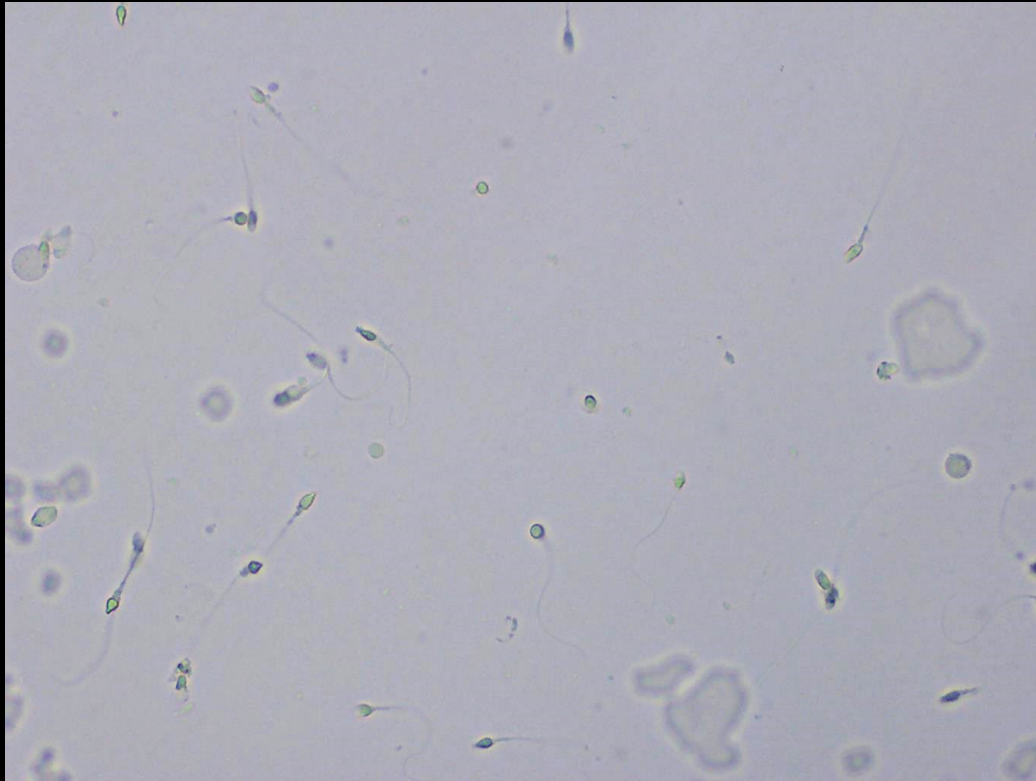


Imagem: LACIT – UFSC

- Exame microscópico inicial para determinar a diluição necessária
- Diluição com fixador para imobilização dos espermatozoides
- Após a diluição, os dois lados do hemocitômetro são carregados

Concentração

Câmara de Neubauer

10 a 15
minutos

Câmara Úmida

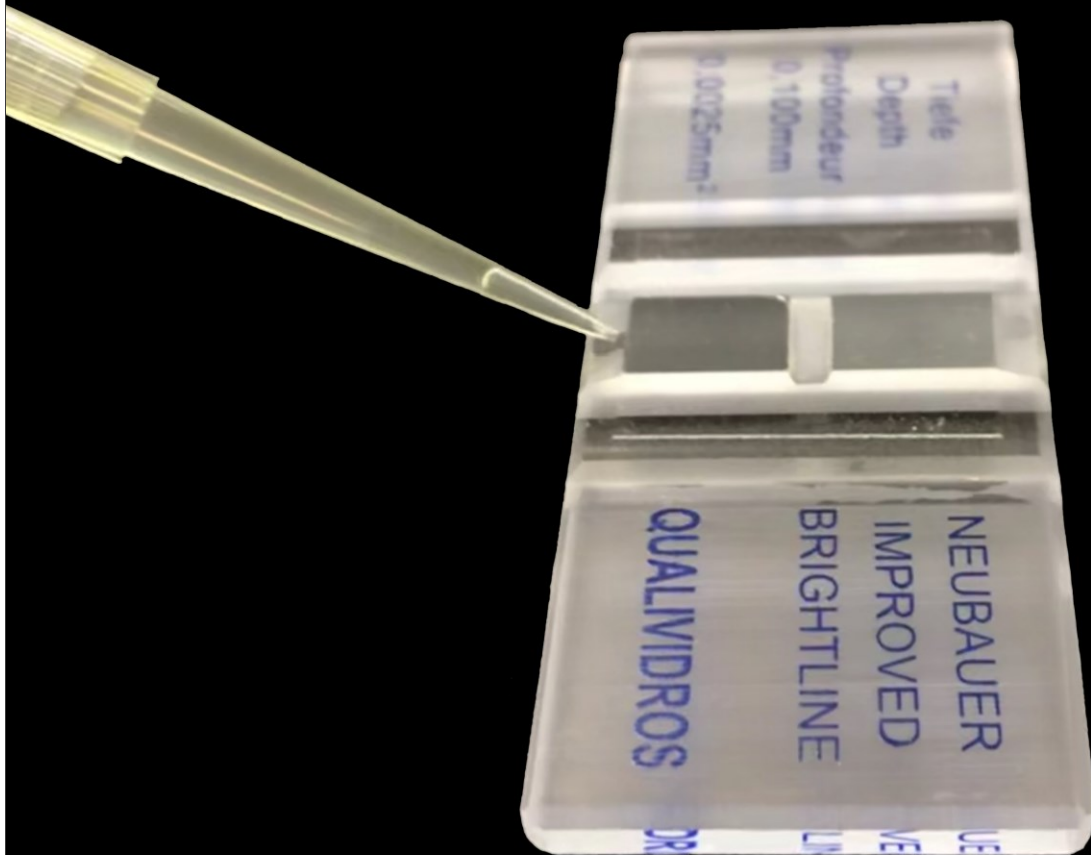


Imagem: LACIT – UFSC

WHO, 2021

Concentração

Câmara de Neubauer

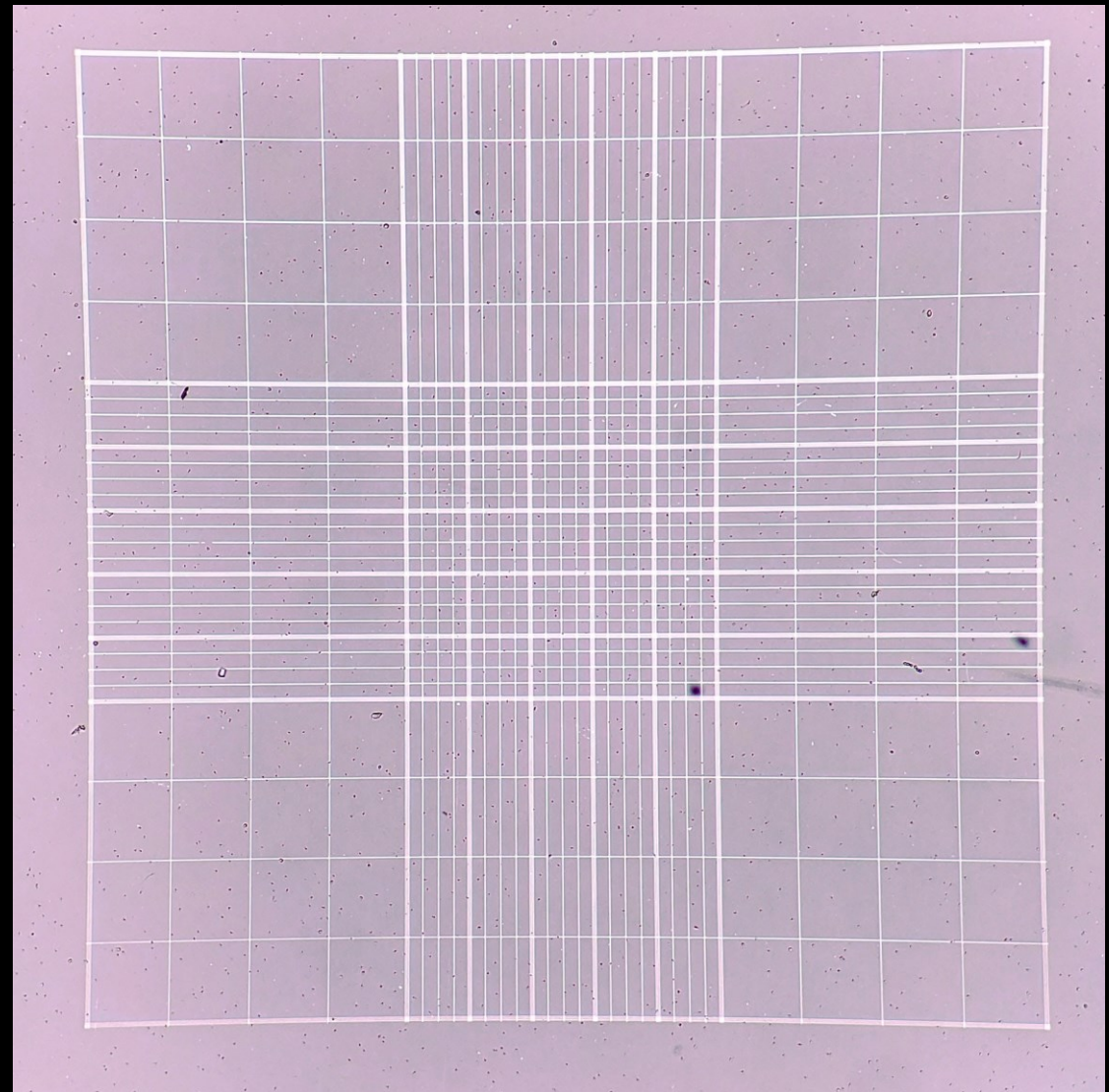


Imagem: LACIT – UFSC

Câmara de Neubauer

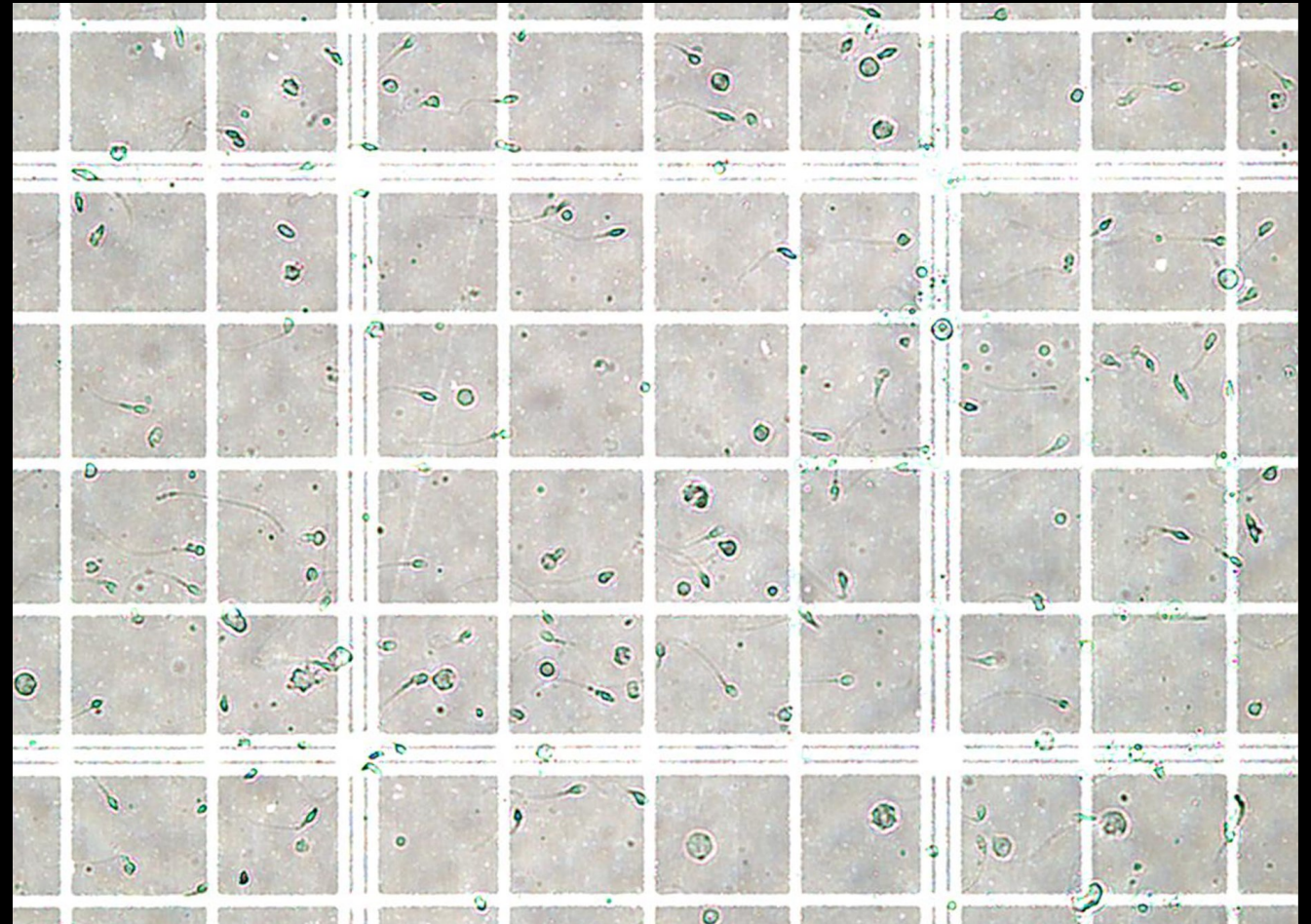
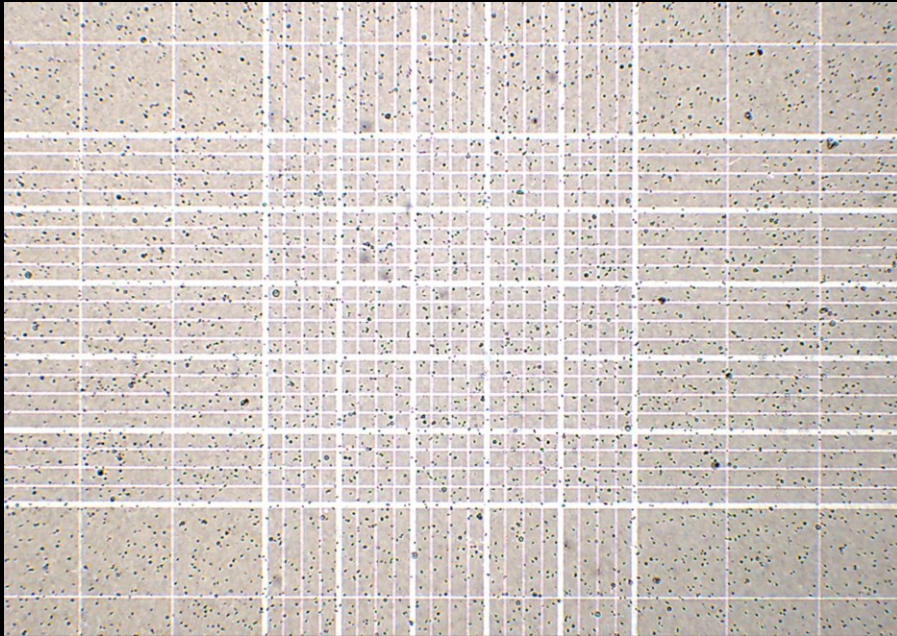


Imagem: LACIT – UFSC

São contados apenas espermatozoides maduros, com cauda

Ao menos 200 espermatozoides devem ser contados

Contagem deve ser feita em duplicata

Valor Normal → acima de 16.000.000/ml

Table 2.1 Sufficient volumes of ejaculates – final volumes of diluted sperm suspensions for adequate handling

Spermatozoa per ×400 field	Spermatozoa per ×200 field	Dilution	Ejaculate (μl)	Fixative (μl)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2 450
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

Table 2.4 Calculation of sperm concentration from sperm count

Dilution	Number of <i>large squares</i> counted in each chamber			Number of <i>grids</i> counted in each chamber							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
	Correction factor values										
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

Câmara de Makler

- Banho-maria por 5 minutos
- 5 μl de amostra
- Aplicação imediata da lamínula

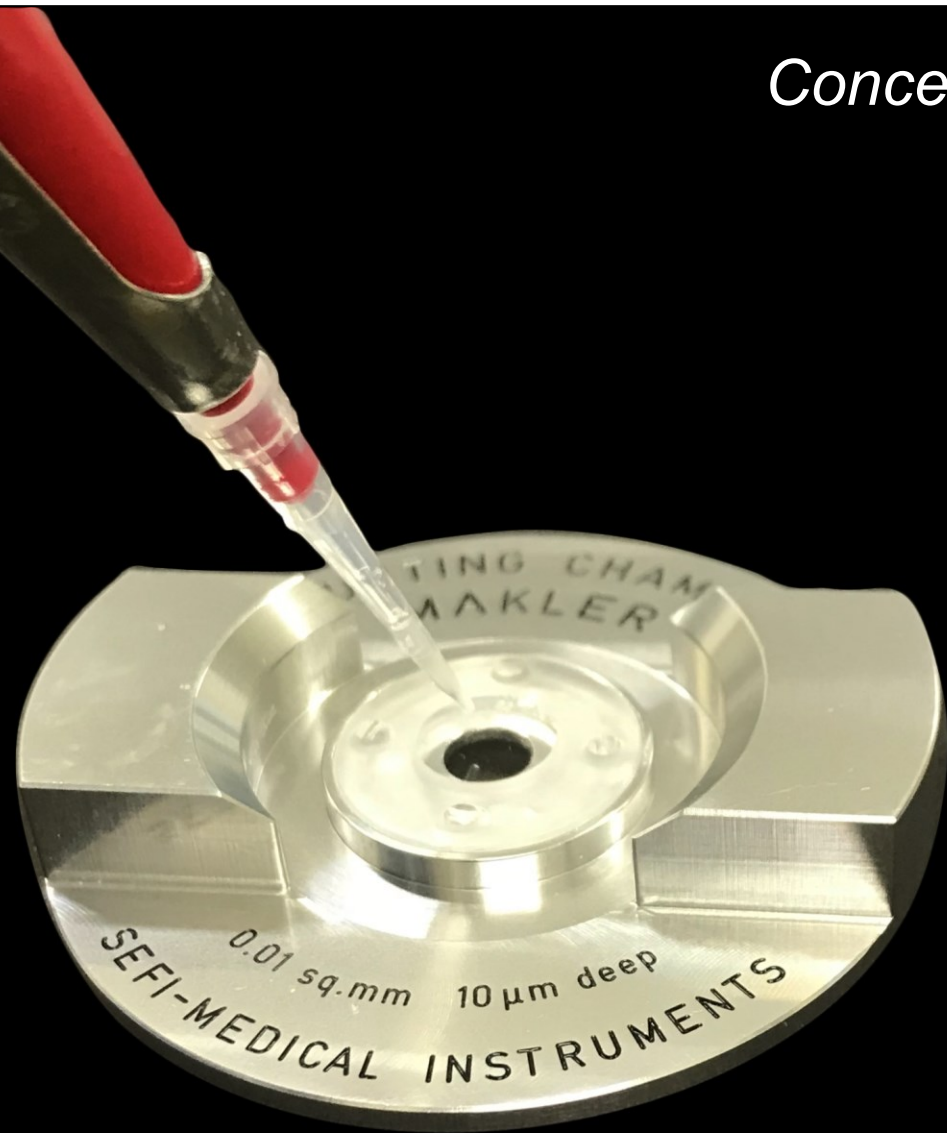
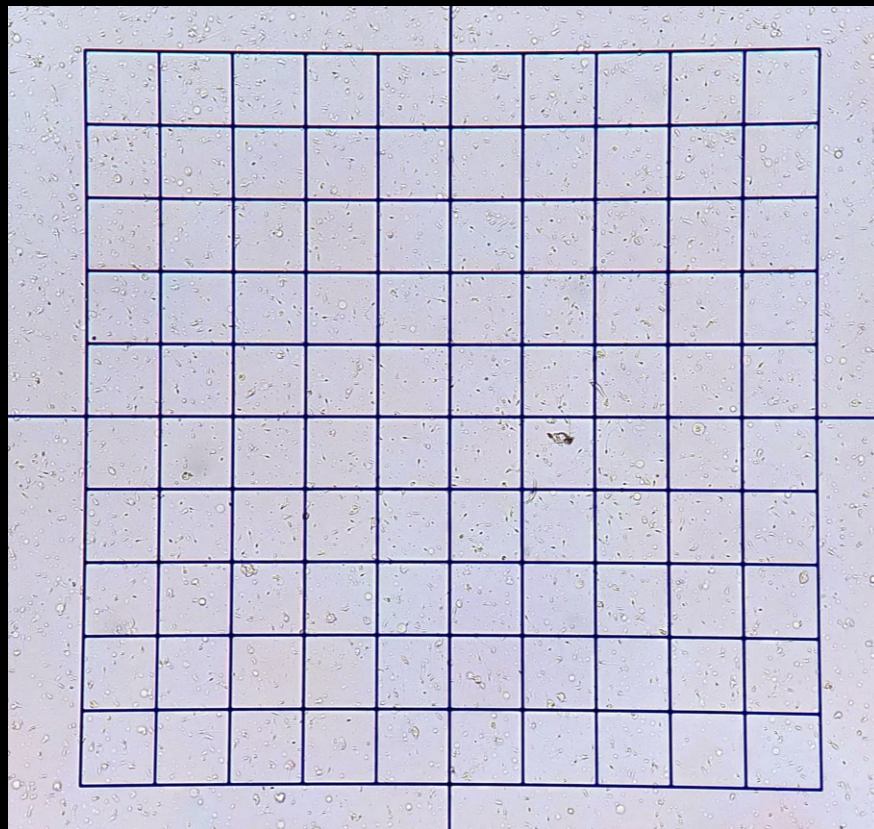


Imagem: LACIT – UFSC

Câmara de Makler



Concentração

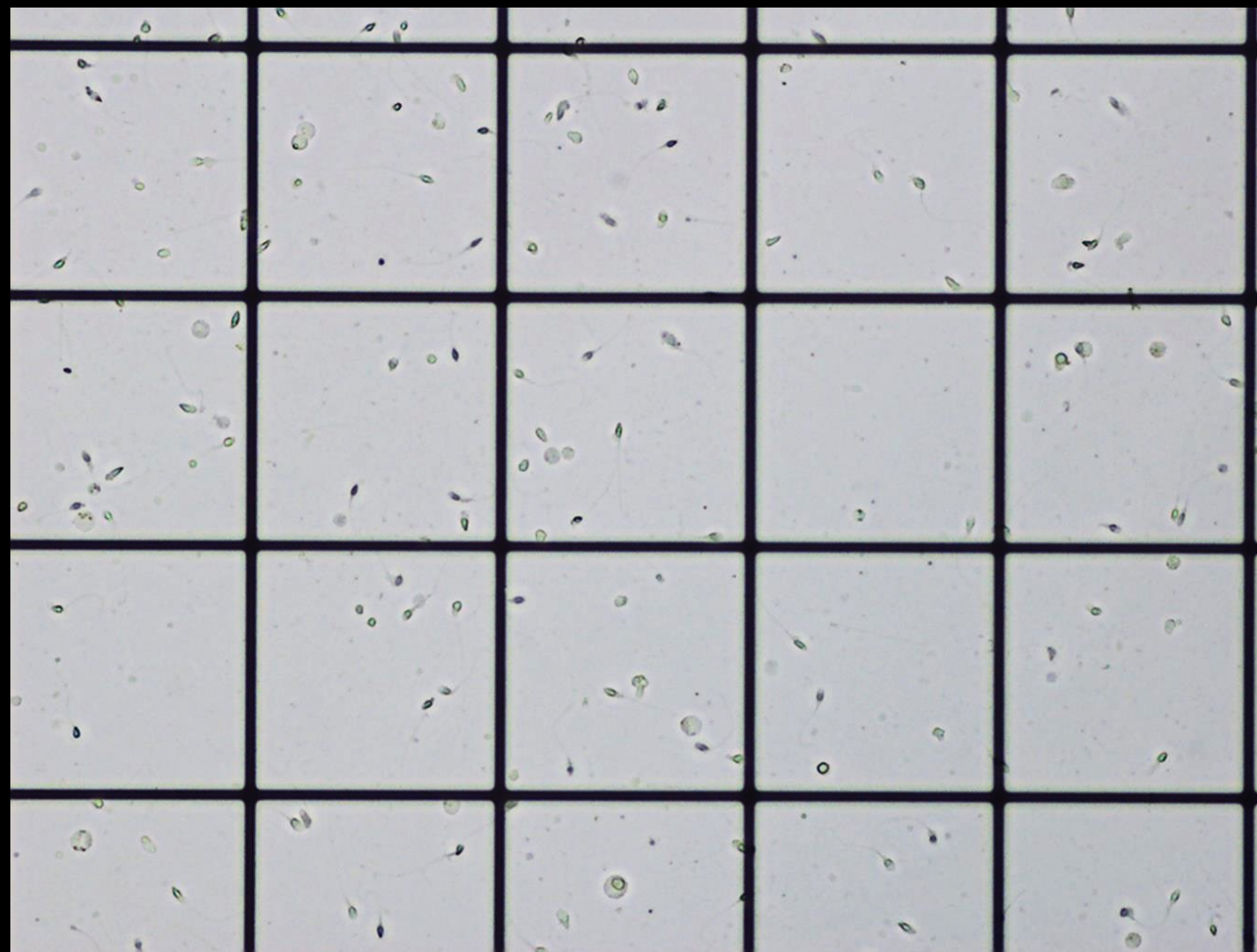


Imagem: LACIT –UFSC

JBRA Assisted Reproduction 2024;28(2):215-223
doi: 10.5935/1518-0557.20240023

Original article

Agreement and internal quality assurance of the Neubauer hemocytometer and Makler chamber for human sperm concentration determination

Ane Francyne Costa¹, Fabiana Botelho de Miranda Onofre¹, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre¹

¹Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

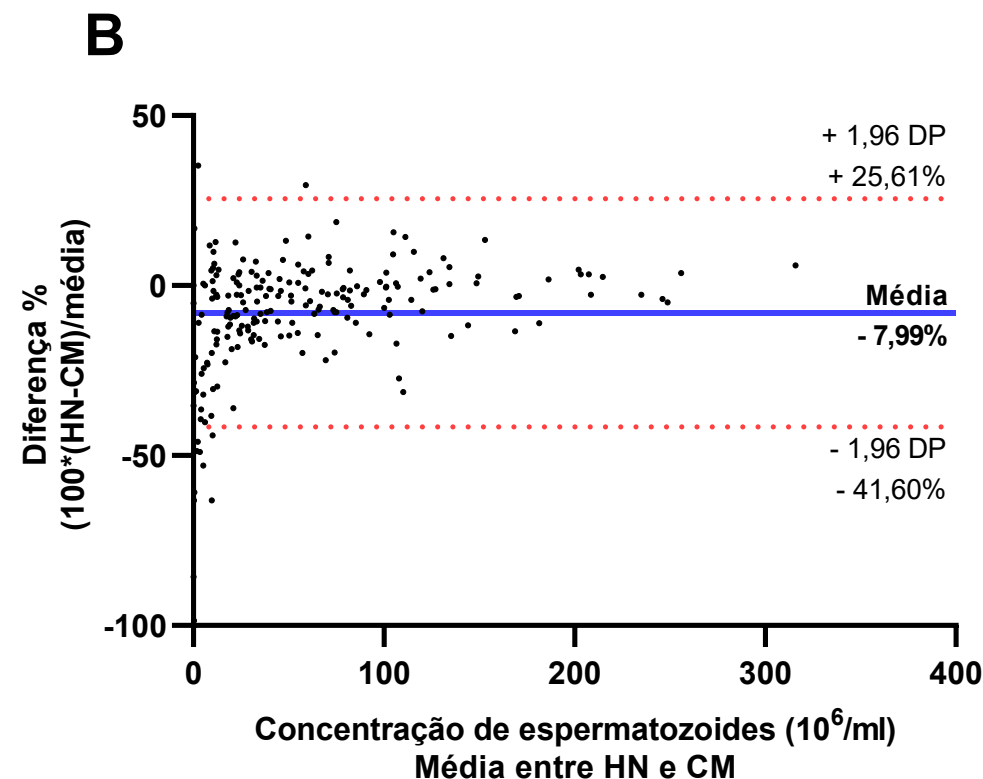
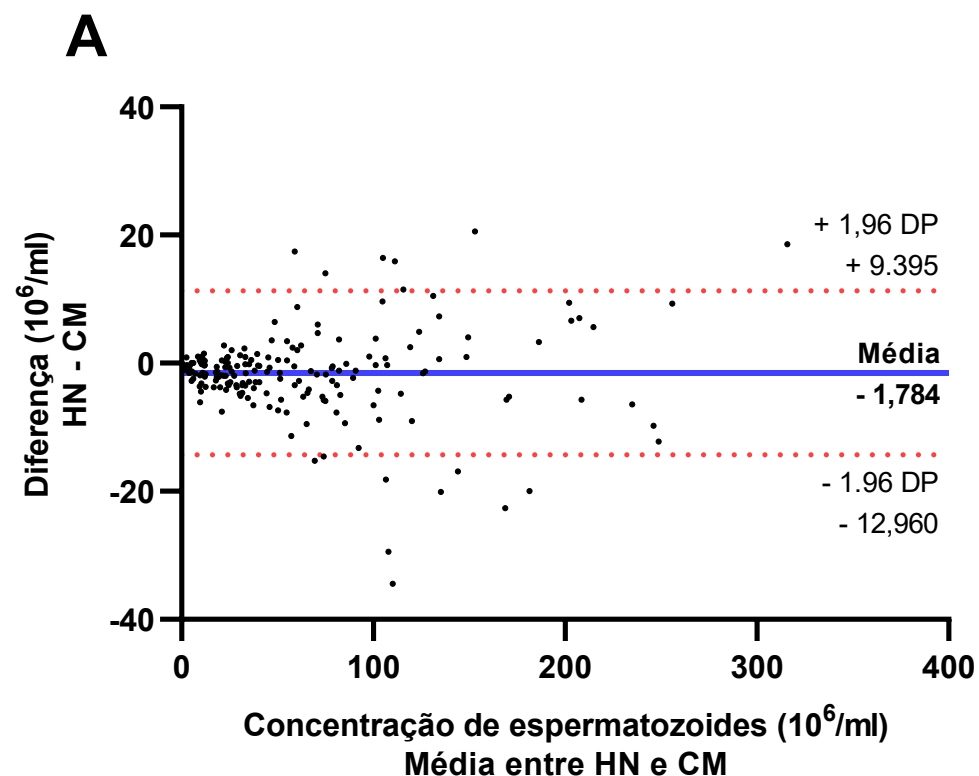
Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

Método de contagem de espermatozoides	n	Média (10 ⁶ /ml)	DP	IC 95% inferior	IC 95% superior
Hemocitômetro de Neubauer	212	57,3	58,5	49,4	65,2
Câmara de Makler	212	58,8	58,4	50,9	66,7

n = número de amostras; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança

Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

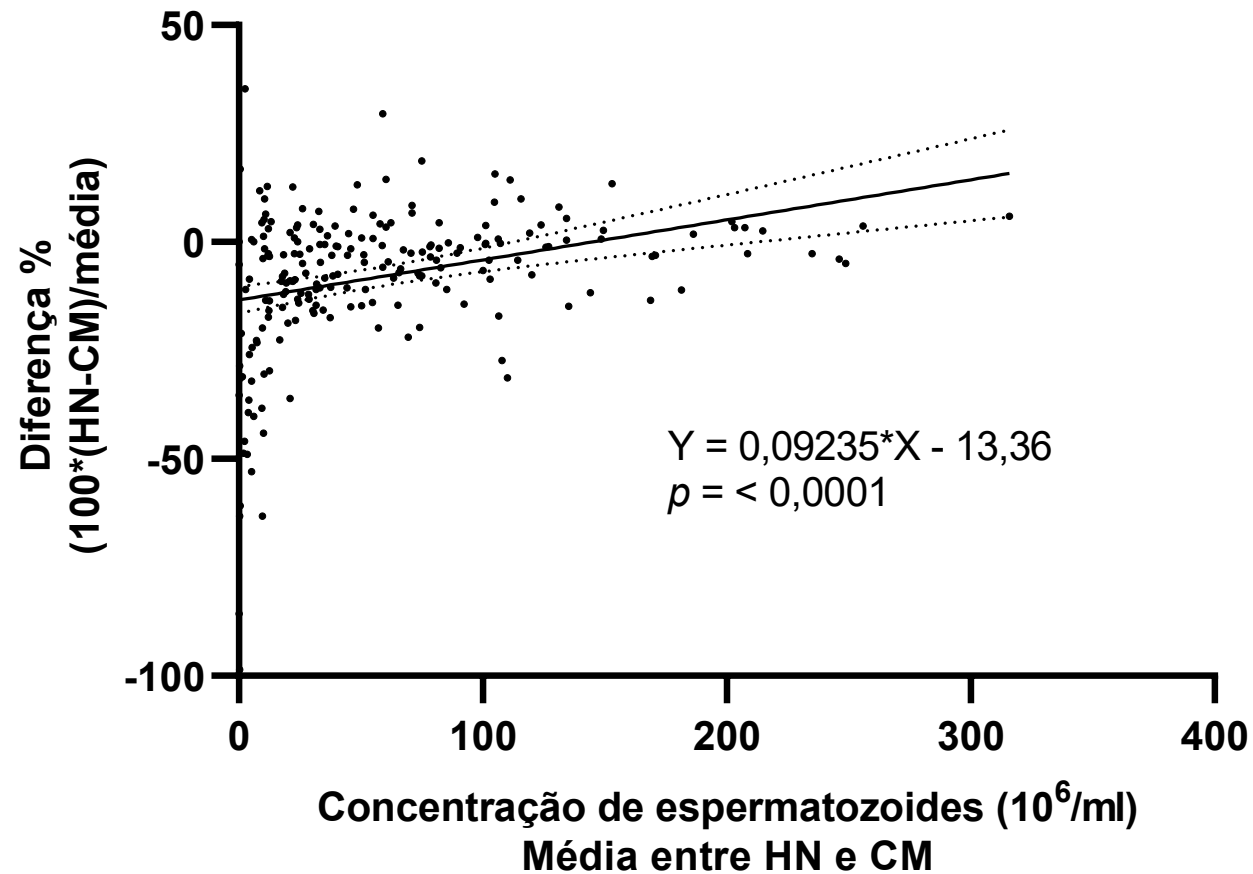
Gráfico de Bland e Altman



Viés fixo: $p < 0,0001$

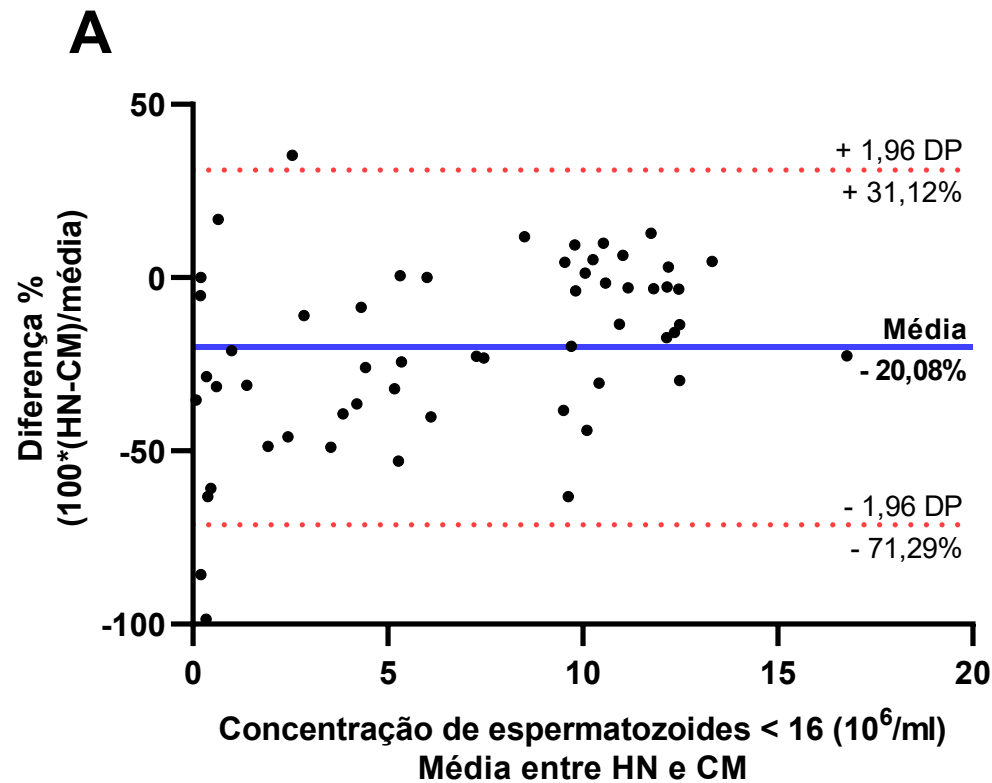
Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

Regressão linear

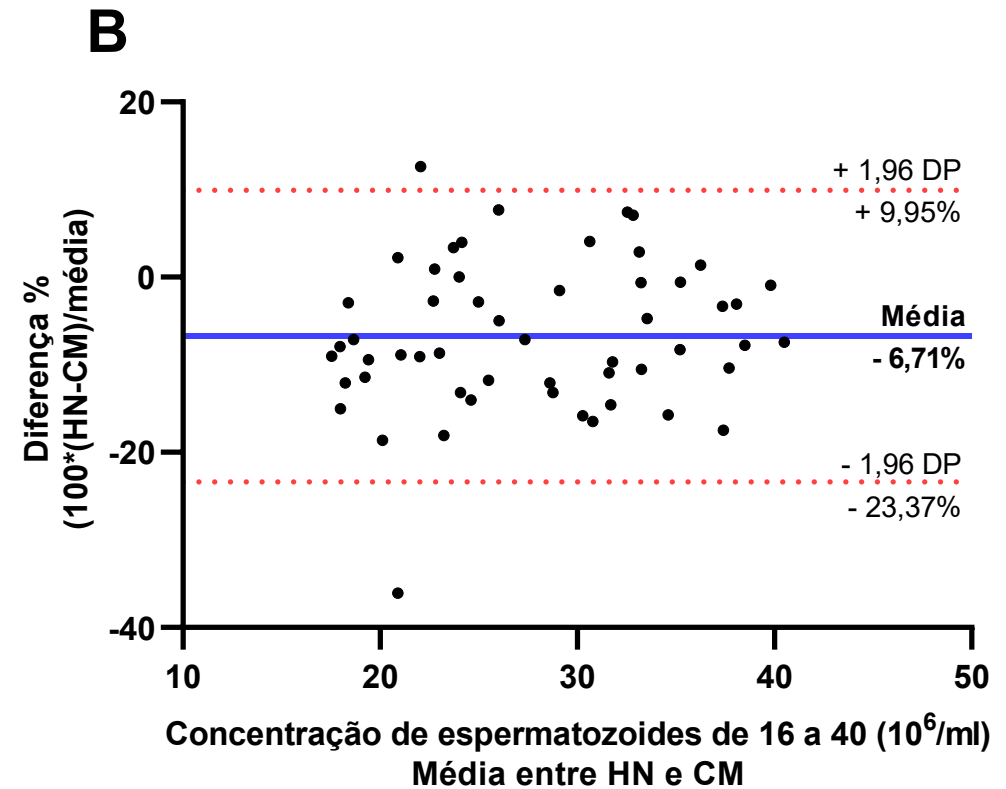


Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

Comparação de diferentes faixas de concentração



Viés fixo: $p < 0,0001$



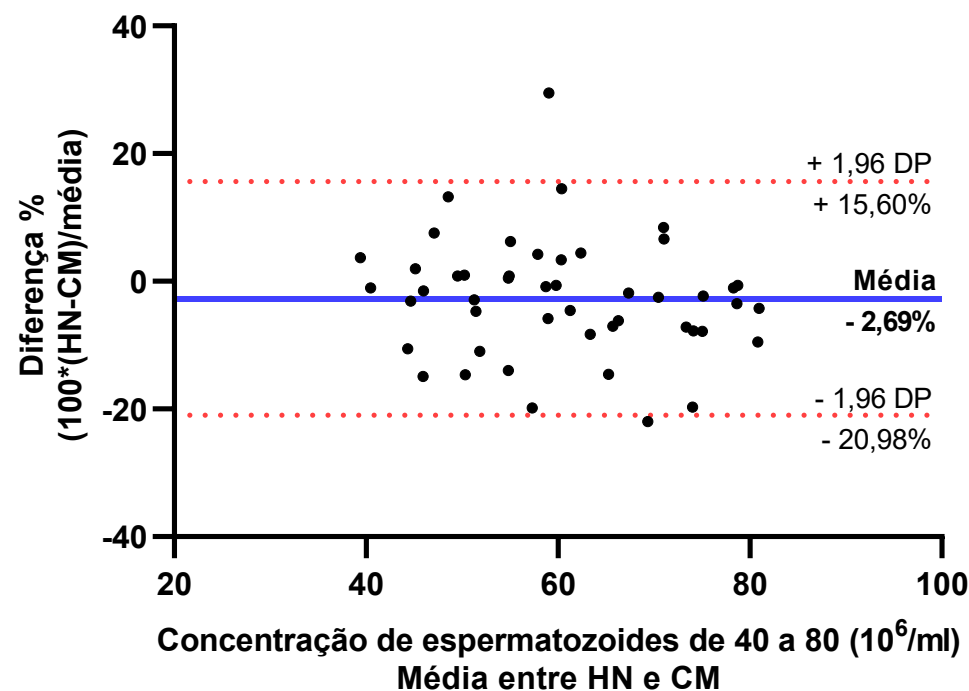
Viés fixo: $p < 0,0001$

Diferenças determinadas com teste t. $p < 0,05$

Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

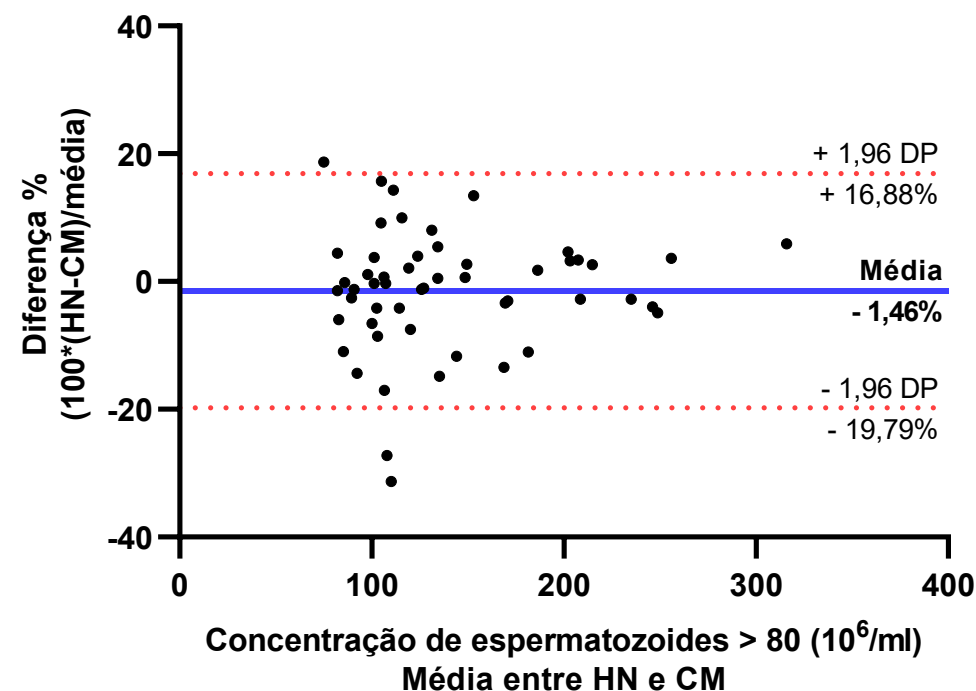
Comparação de diferentes faixas de concentração

C



Viés fixo: $p = 0,052$

D



Viés fixo: $p = 0,421$

Oligozoospermia → quando número de espermatozoides é menor que 16.000.000/ml

- Pode ser permanente
- periódica (confirmado através de espermogramas seriados, com intervalo de 2 semanas, durante período de 3 meses)

Causas → infecção do trato genital, anomalias cromossômicas, alterações hormonais e abstinência sexual

Azoospermia → ausência de espermatozoide no sêmen

Causas → mesmas que causam oligozospermia, além de obstruções biliares, agenésias gonodais e ausência de células de Sertoli

Contagem total

Concentração (hemocitômetro de Neubauer) x Volume

Células redondas e hemácias

- Células germinativas, leucócitos e células epiteliais
- Mesmo procedimento para a contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer

Células redondas e hemácias

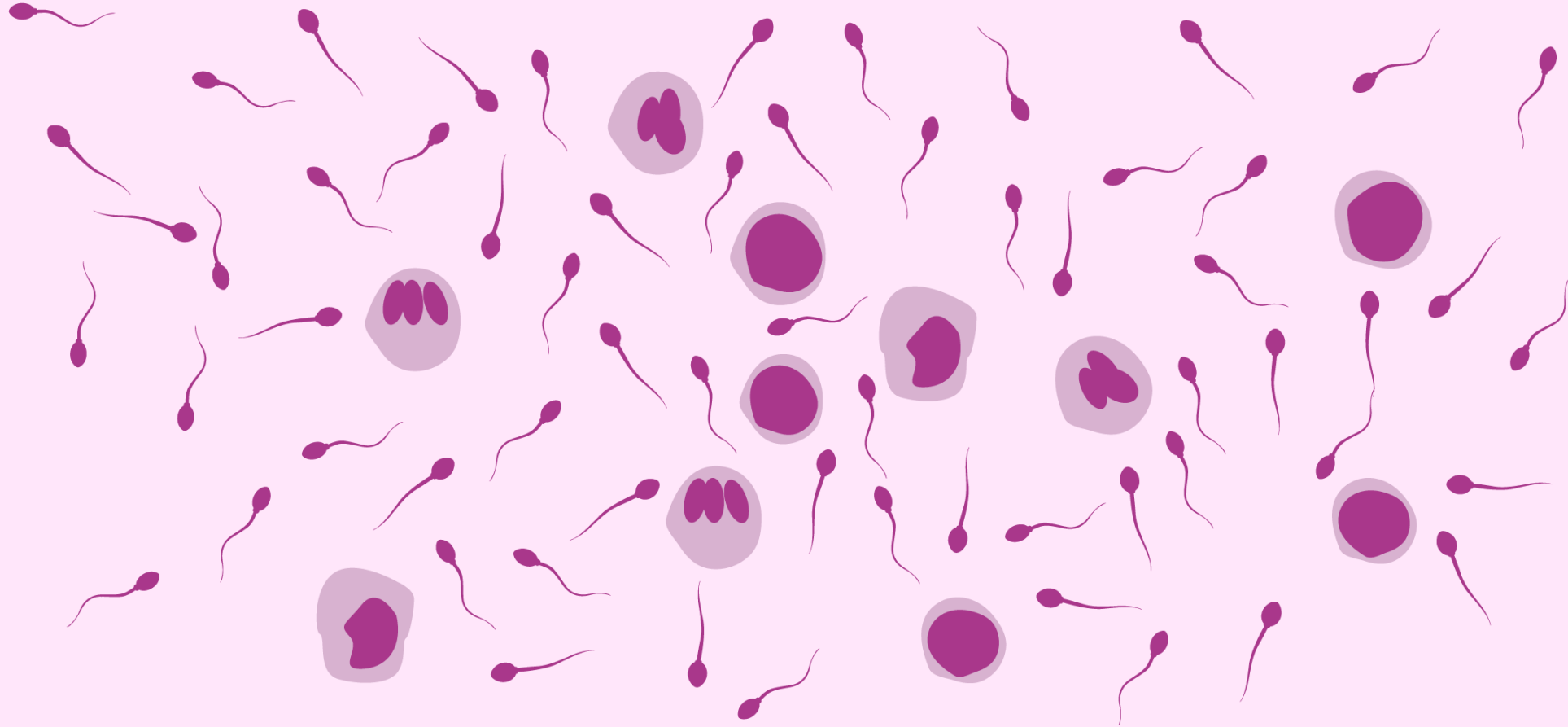
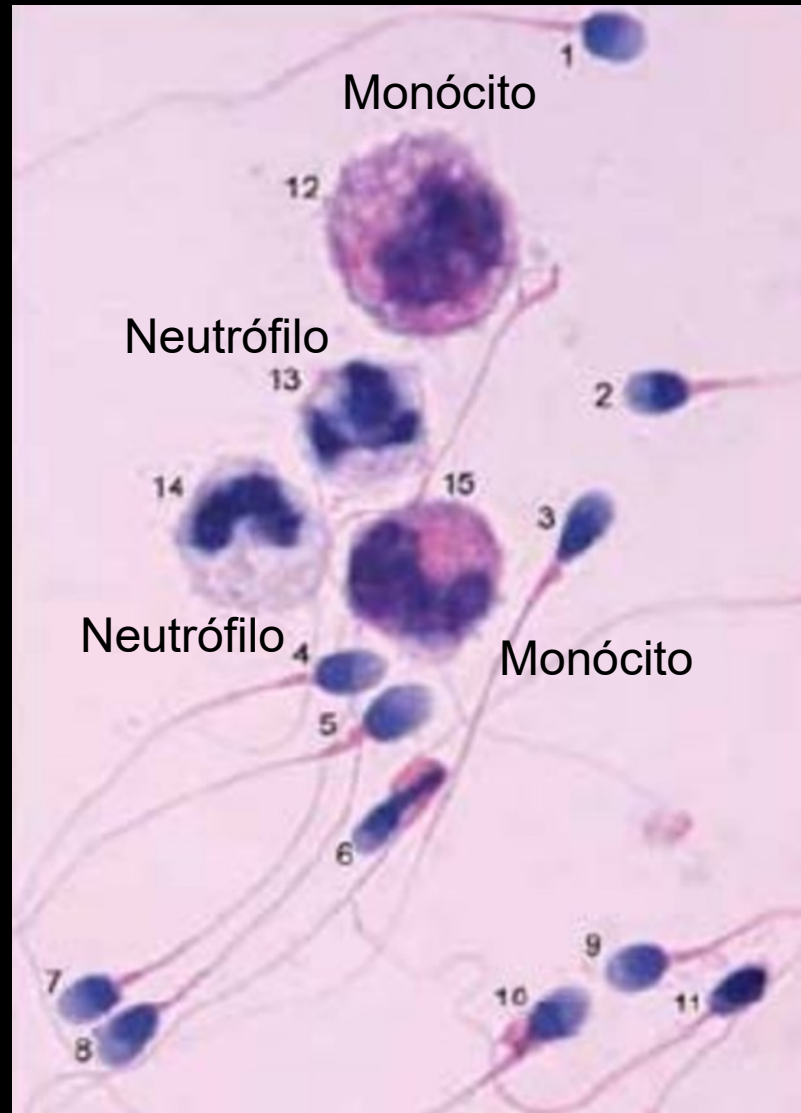
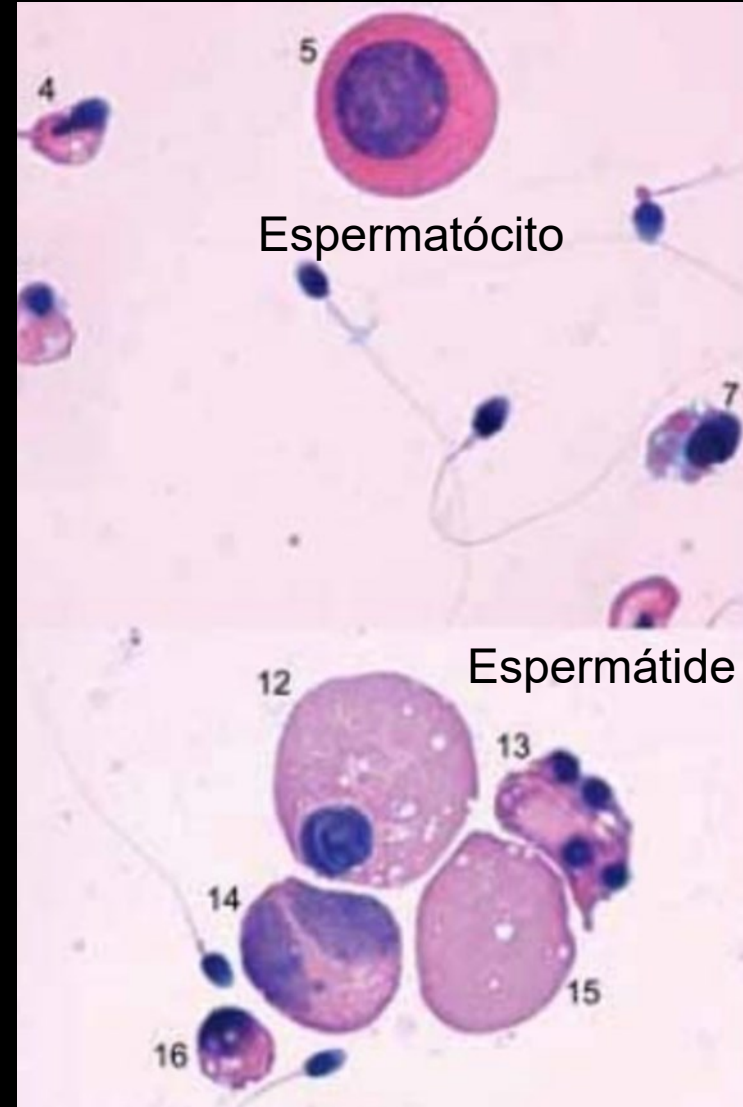
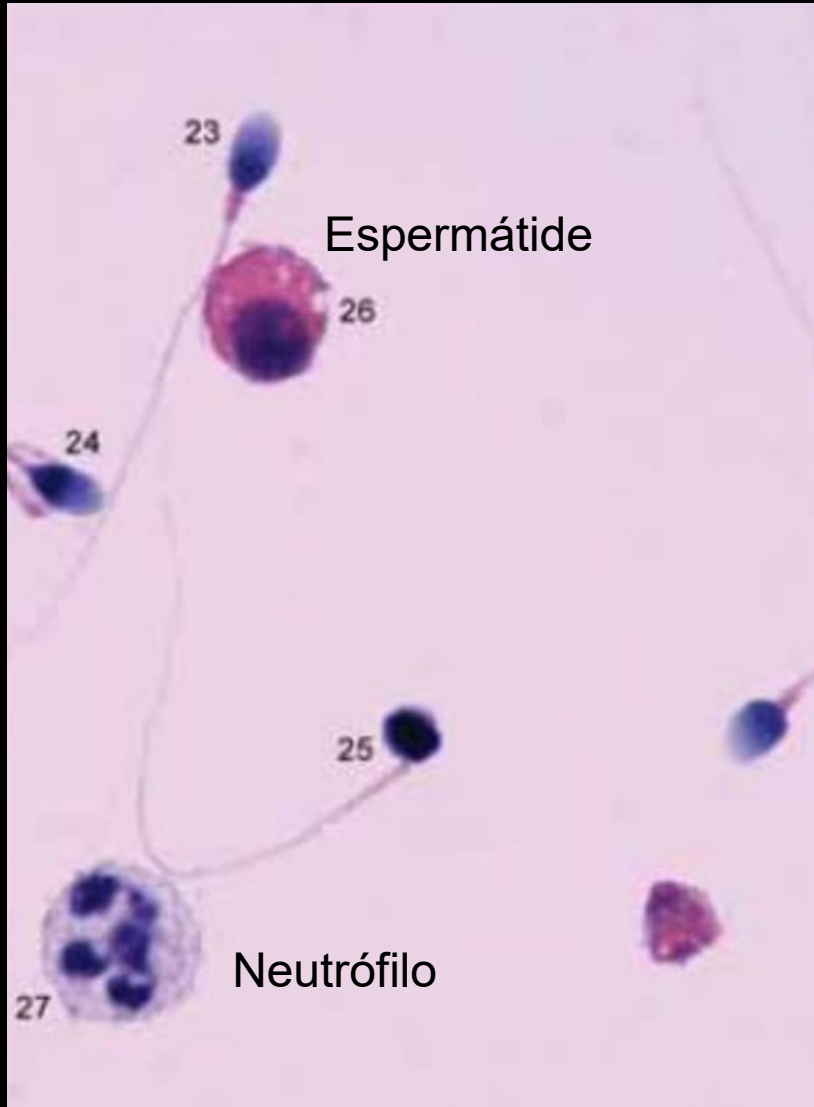


Imagem: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Células redondas e hemácias



Células redondas e hemácias



Morfologia

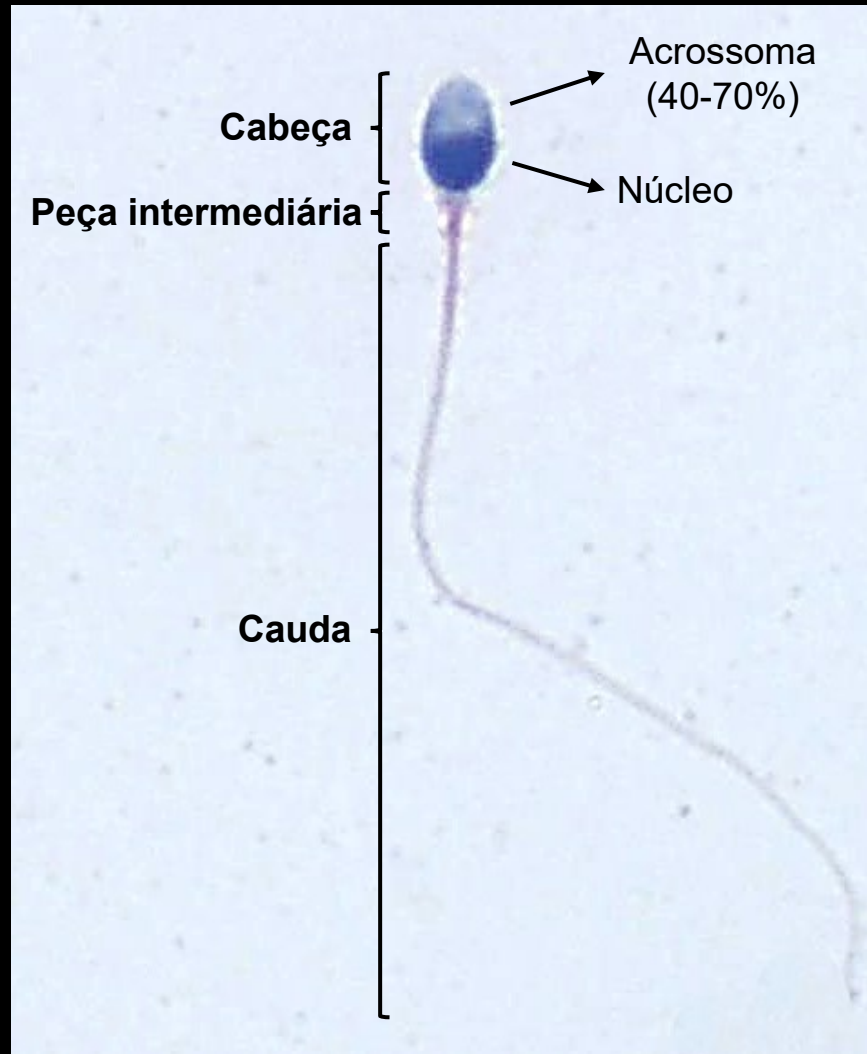


Imagem: LACIT –UFSC

- Coloração de Papanicolaou
 - Formas normais (>4%)
 - Defeitos em cabeça, peça intermediária, cauda e excesso de citoplasma residual

Anomalias de cabeça

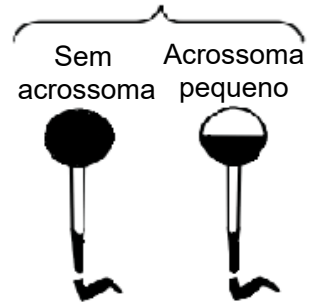
Fusiforme



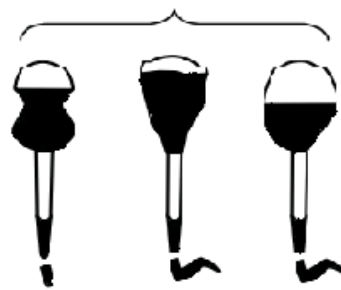
Piriforme



Cabeça redonda



Cabeça amorfa



Macrocefálico



Microcefálico



Bicefálico



Anomalias de peça intermediária

Peça grossa



Peça fina



Excesso de citoplasma residual



Anomalias de cauda

Cauda curta

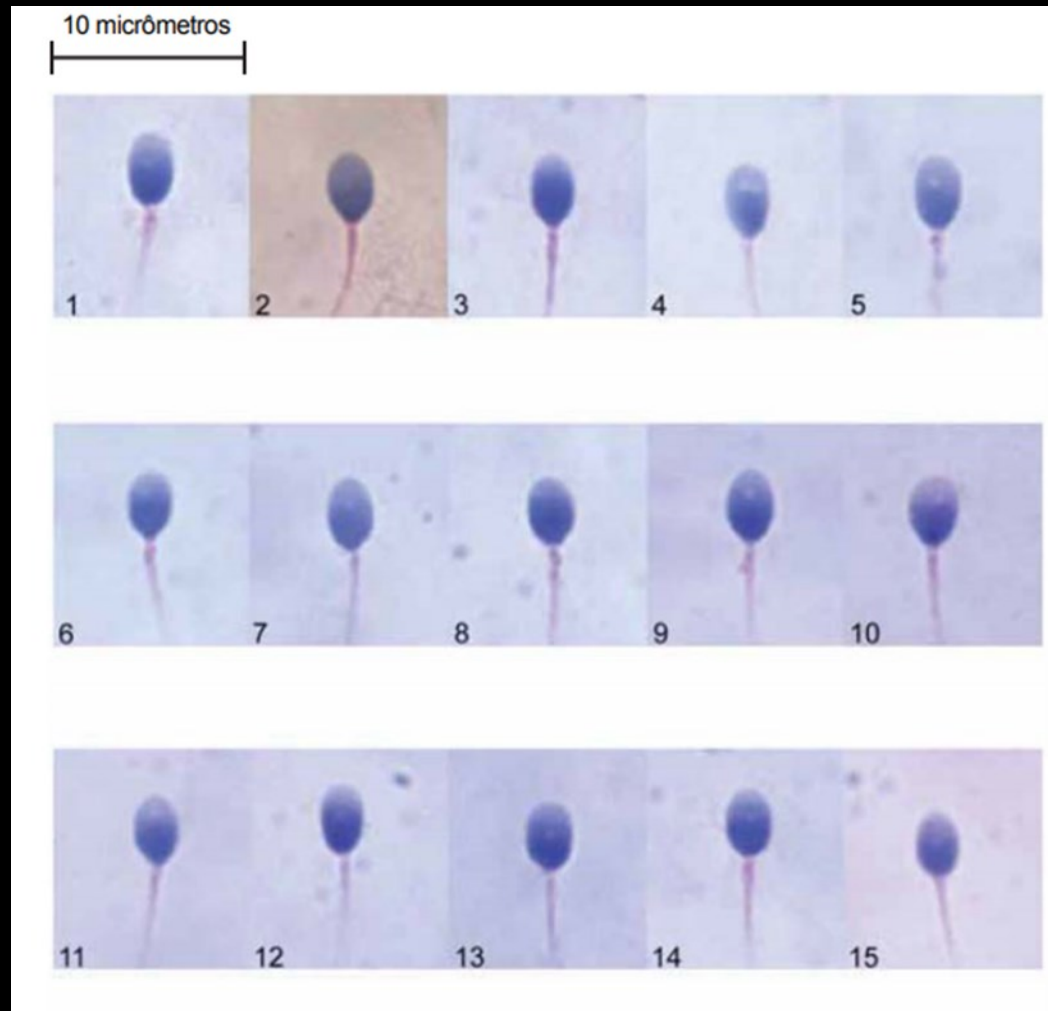


Cauda enrolada



Bicaudal

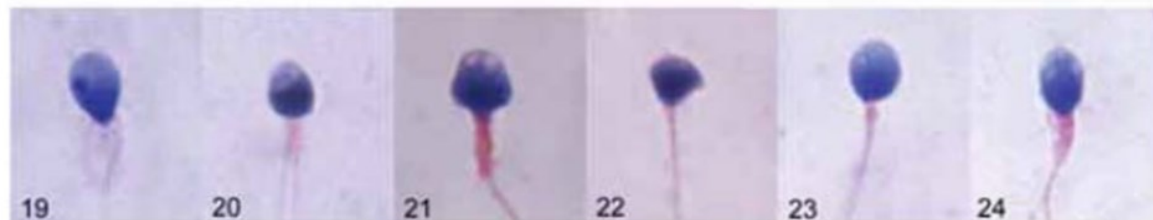
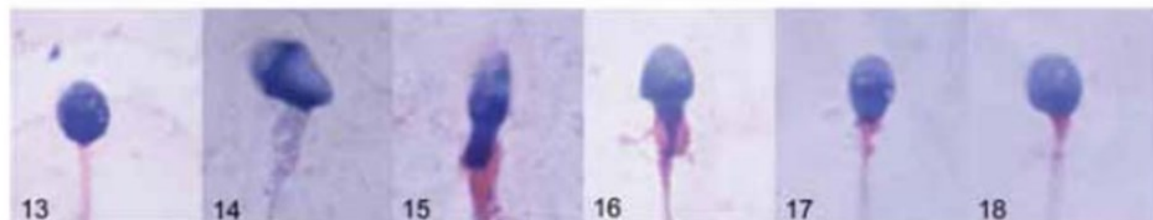
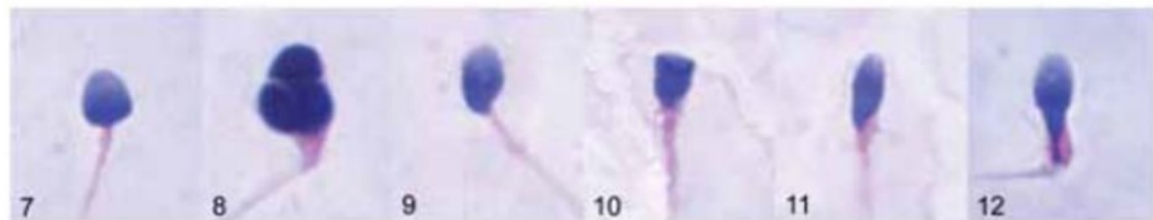
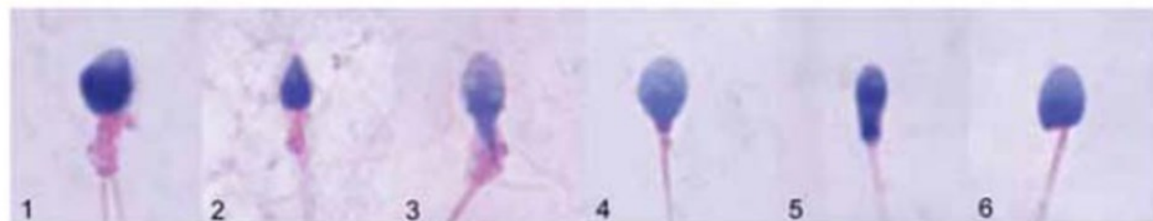




Espermatozoides
normais

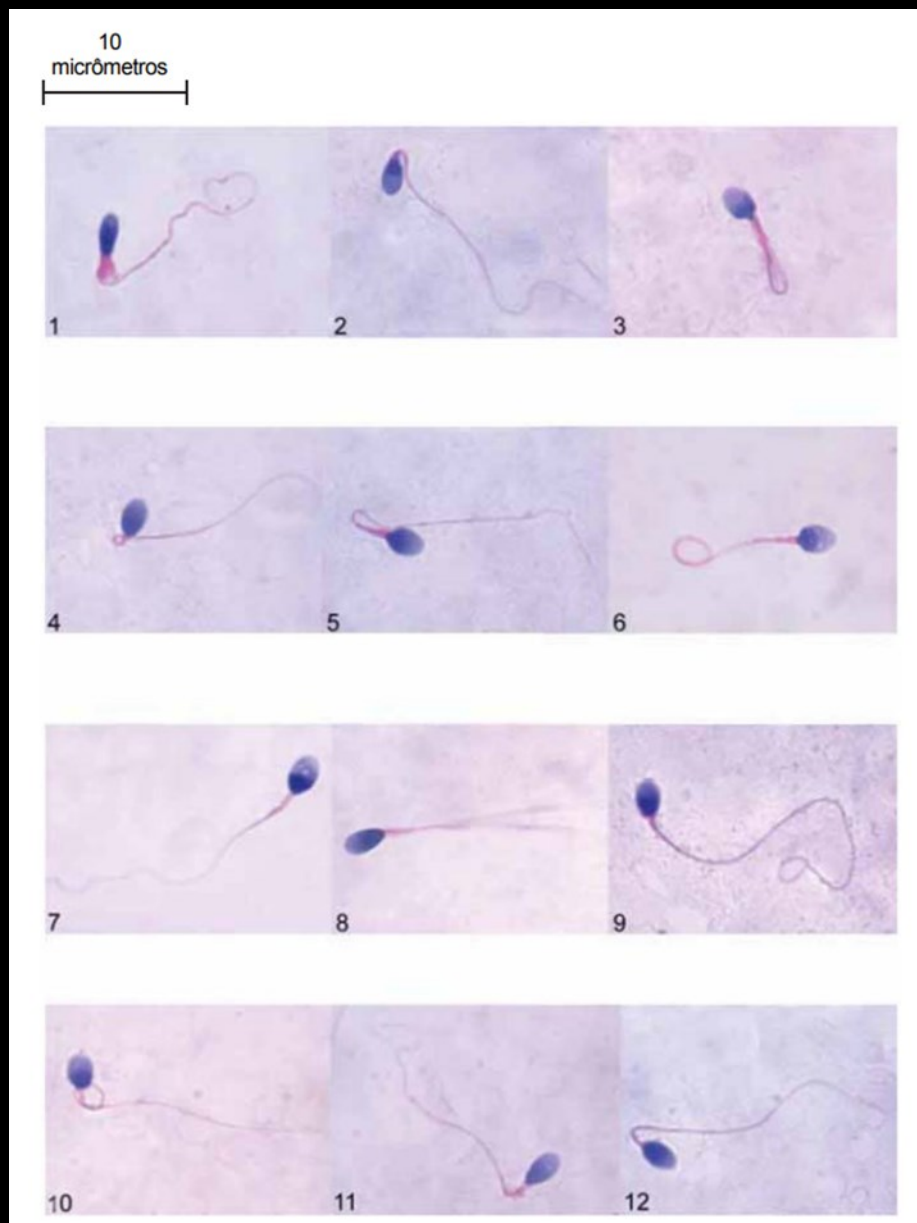
Morfologia

10
micrômetros



Espermatozoides Anormais

Morfologia



Espermatozoides Anormais

Resultados da análise das características morfológicas do espermatozoide → Valor preditivo como determinante da fertilidade

Número médio de defeitos por espermatozoide → Indicador importante da função espermática tanto *in vivo* como *in vitro*

Espermatozoide morfolologicamente anormal geralmente apresenta múltiplos defeitos

Valor de referência OMS (2010) > 4% normais

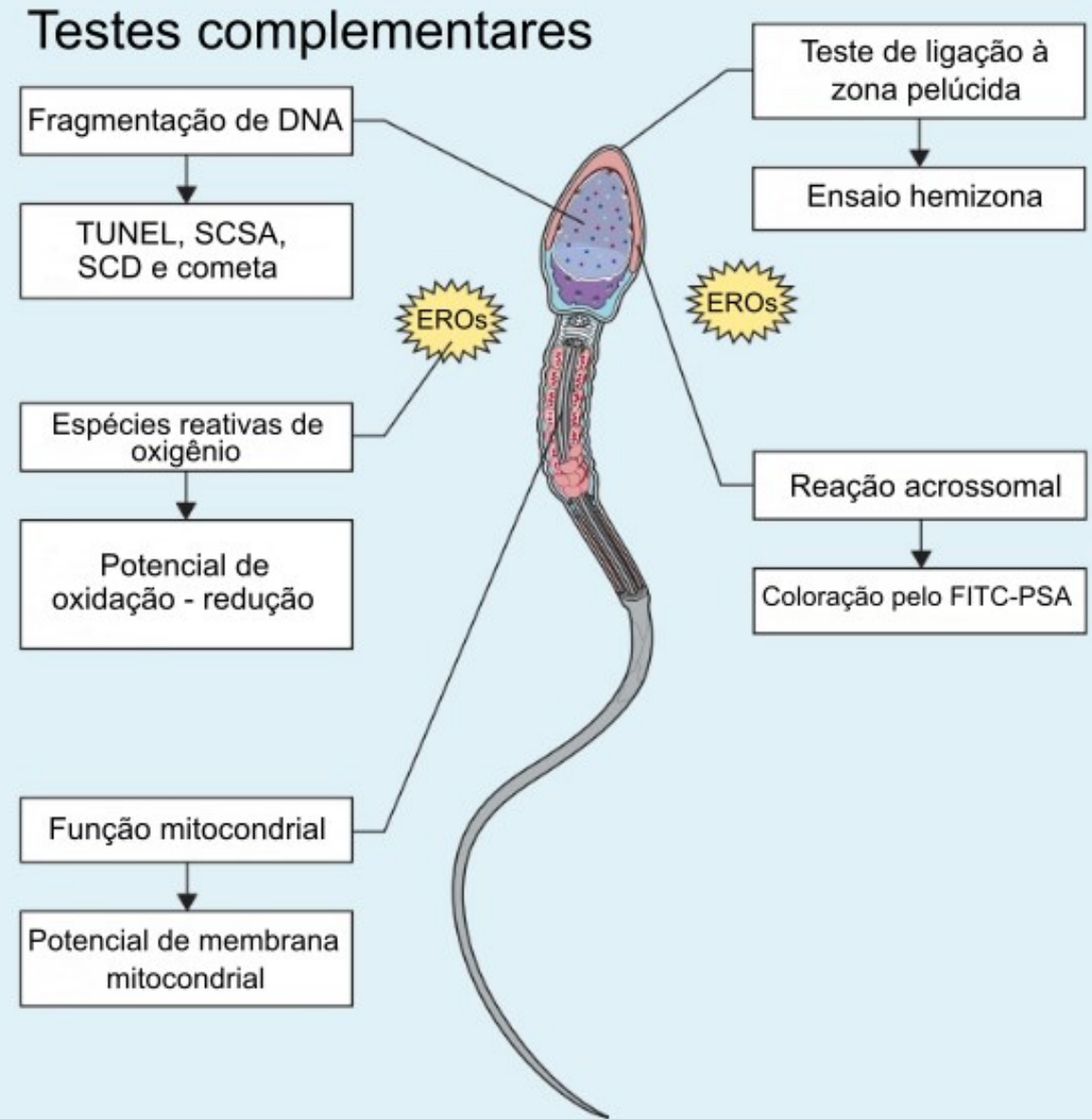
Teratospermia: % de espermatozoides normais abaixo dos limites de referência

Causas: alterações na temperatura escrotal como varicocele e hidrocele

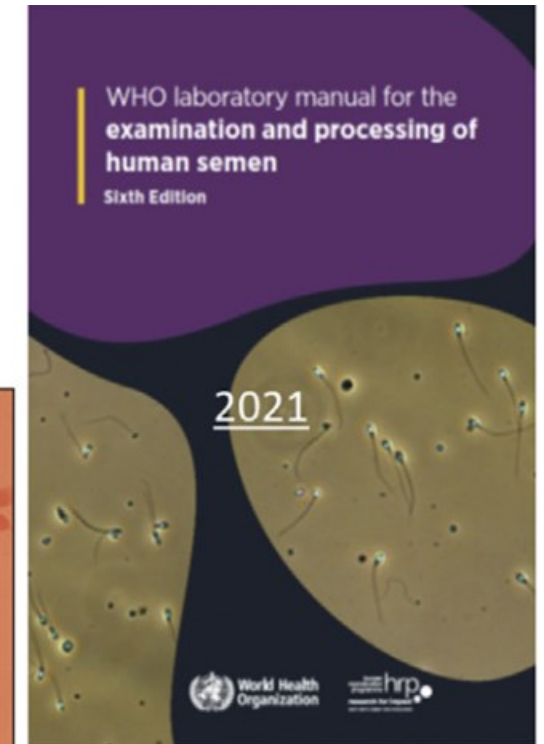
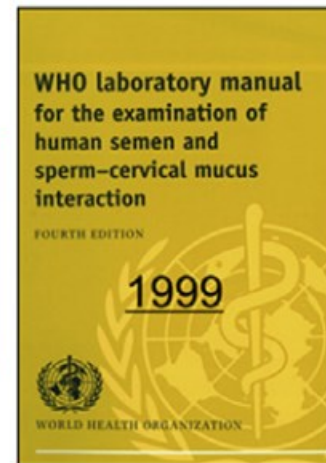
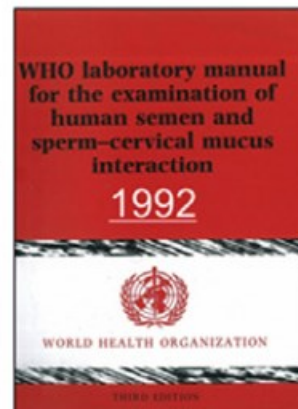
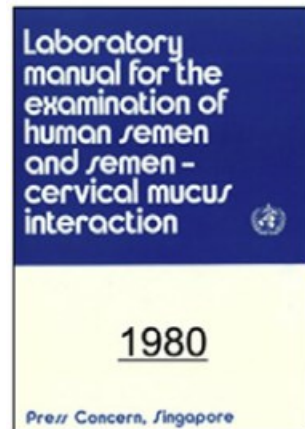
Testes complementares

- Testes de função espermática
- Elucidar problemas não identificados no espermograma que podem ser potenciais causas da infertilidade masculina

FITC-PSA = aglutinina *Pisum sativum* marcada com isotiocianato de fluoresceína; SCD = teste de dispersão da cromatina espermática; SCSA = ensaio de estrutura de cromatina espermática; TUNEL = marcação de "nicks" por dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal.



Edições do manual da OMS para exame e processamento de sêmen humano



Distribuição de resultados de exame de sêmen de homens em casais que iniciaram uma gravidez natural dentro de um ano após início de relação sexual desprotegida

Parâmetro seminal	n	Percentil									
		2,5	5,0	(IC 95%)	10	25	50	75	90	95	97,5
Volume (ml)	3586	1,0	1,4	(1,3 – 1,5)	1,8	2,3	3,0	4,2	5,5	6,2	6,9
Concentração (10 ⁶ /ml)	3587	11	16	(15 – 18)	22	36	66	110	166	208	254
Contagem total (10 ⁶ por ejaculado)	3584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Motilidade total (a+b+c, %)	3488	35	42	(40 – 43)	47	55	64	73	83	90	92
Motilidade progressiva (a+b, %)	3389	24	30	(29 – 31)	36	45	55	63	71	77	81
Motilidade não progressiva (c, %)	3387	1	1	(1 – 1)	2	4	8	15	26	32	38
Espermatozoides imóveis (d, %)	2800	15	20	(19 – 20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitalidade (%)	1337	45	54	(50 – 56)	60	69	78	88	95	97	98
Formas normais (%)	3335	3	4	(3,9 – 4,0)	5	8	14	23	32	39	45

Controle de qualidade



Controle de qualidade

Essencial para garantir a confiabilidade e comparabilidade dos resultados do espermograma

Controle interno: amostras de controle referência (comerciais) ou recontagem de uma alíquota por um segundo analista ou em um segundo dia para verificar a variabilidade intra e inter-analista. A diferença entre as contagens deve estar dentro de limites estatisticamente aceitáveis

Controle externo: avaliar a acurácia dos resultados do laboratório em comparação com um padrão de referência externo e a consistência com outros laboratórios

O programa externo envia ao laboratório amostras de sêmen liofilizadas, fixadas ou vídeos de motilidade/concentração

A participação regular no programa de controle externo é fundamental para a acreditação do laboratório e garante que os resultados dos pacientes sejam confiáveis no contexto global



OBRIGADA!

A microscopic view of several sperm cells, showing their characteristic oval heads and long, wavy tails, set against a dark background.

Referências

- AGARWAL, Ashok et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, v. 13, abr. 2015.
- AGARWAL, Ashok et al. Male infertility. *Lancet (London, England)*, v. 397, n. 10271, p. 319–333, 23 jan. 2021.
- CAMPBELL, Martin J. et al. Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*, v. 9, n. 3, p. 817–822, maio 2021.
- FERLIN, Alberto; ARREDI, Barbara; FORESTA, Carlo. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, v. 22, n. 2, p. 133–141, ago. 2006.
- GORE, A. C. et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, v. 36, n. 6, p. E1–E150, dez. 2015.
- GURUNATH, S. et al. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Human Reproduction Update*, v. 17, n. 5, p. 575–588, 2011.
- KATZ, Darren J.; TELOKEN, Patrick; SHOSHANY, Ohad. Male infertility - The other side of the equation. *Australian Family Physician*, v. 46, n. 9, p. 641–646, set. 2017.
- LEVINE, Hagai et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Human Reproduction Update*, p. dmac035, 15 nov. 2022.
- LIANG, Yuanhao et al. Global, regional, and national prevalence and trends of infertility among individuals of reproductive age (15-49 years) from 1990 to 2021, with projections to 2040. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 40, n. 3, p. 529–544, 1 mar. 2025.
- RING, Joshua D.; LWIN, Aye A.; KÖHLER, Tobias S. Current medical management of endocrine-related male infertility. *Asian Journal of Andrology*, v. 18, n. 3, p. 357–363, maio 2016.
- WANG, Christina et al. Evolution of the WHO “Semen” processing manual from the first (1980) to the sixth edition (2021). *Fertility and Sterility*, v. 117, n. 2, p. 237–245, fev. 2022.
- WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6. ed. Geneva: World Health Organization, HRP, 2021. v. 6