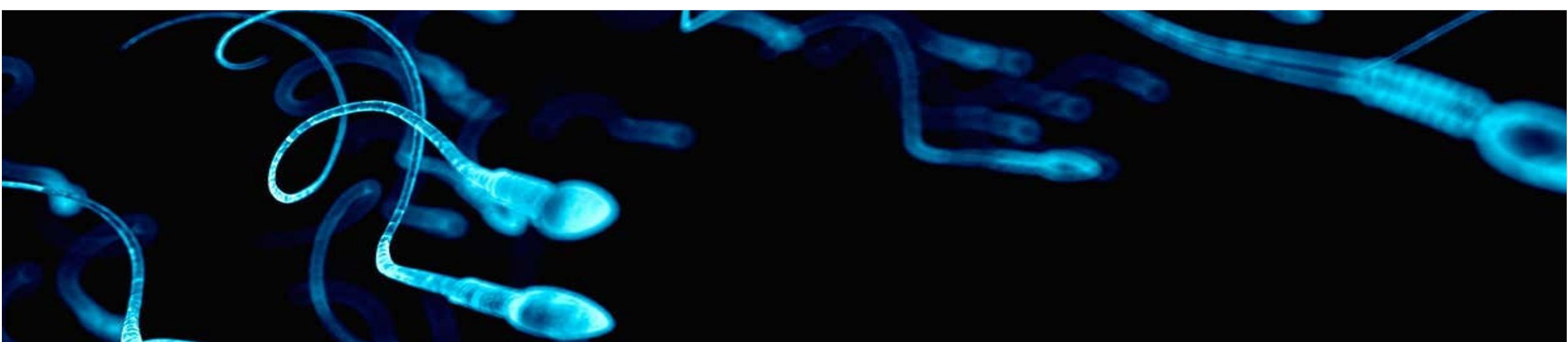




# ESPERMOGRAMA

Ane Francyne Costa

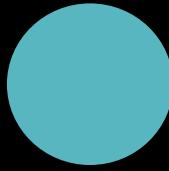


# Ane Francyne Costa

Farmacêutica  
Mestre em Farmácia  
Doutora em Ciências Médicas

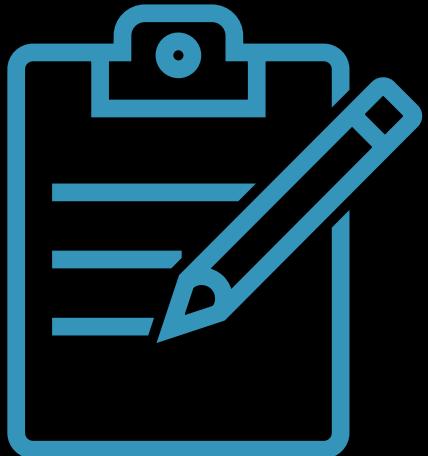


UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SANTA CATARINA  
BRASIL



# Tópicos

---



Infertilidade

---

Espermograma

---

- Exame macroscópico

---

- Exame microscópico

---

Manual da OMS para análise do sêmen

---

Controle de qualidade no espermograma

# Infertilidade

---



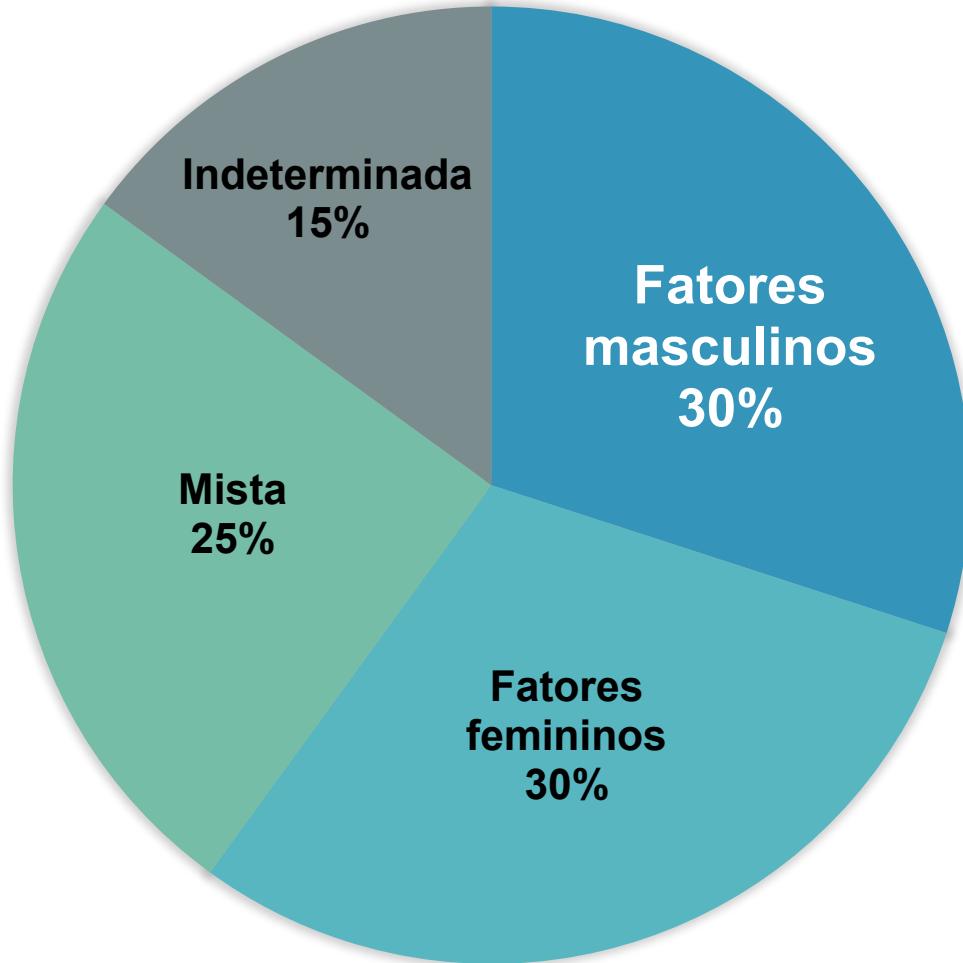
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade é definida como a incapacidade de conceber após 12 meses ou mais de relações sexuais vaginais regulares sem o uso de contraceptivos

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

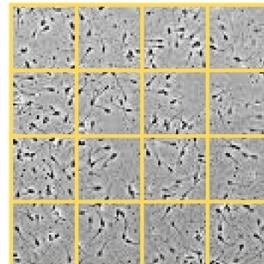


# Infertilidade masculina

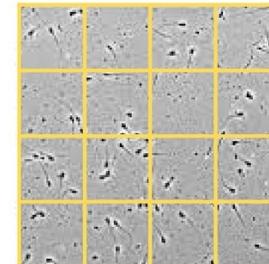
Existe uma preocupação crescente de que a qualidade do sêmen humano está em declínio



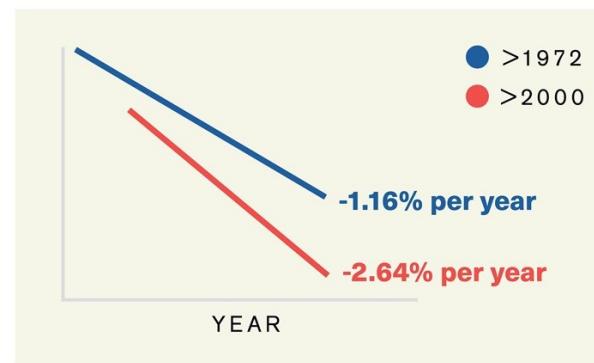
## A contagem de espermatozoides está diminuindo em ritmo acelerado em todo o mundo



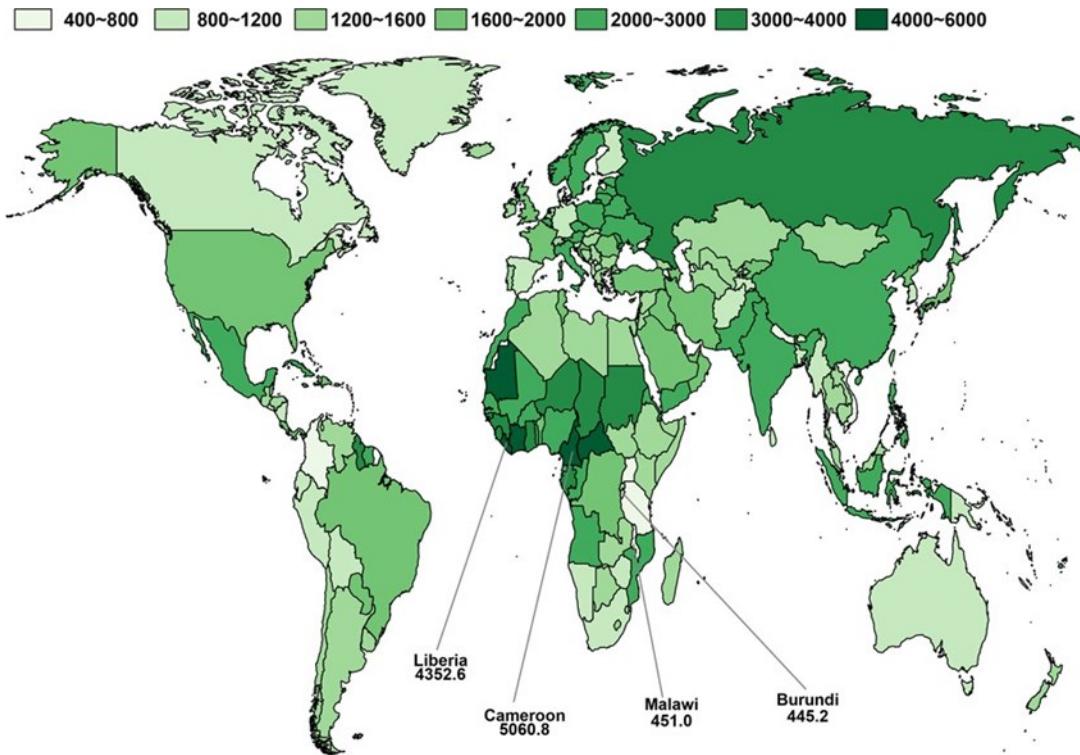
101 mill/ml  
(1973)



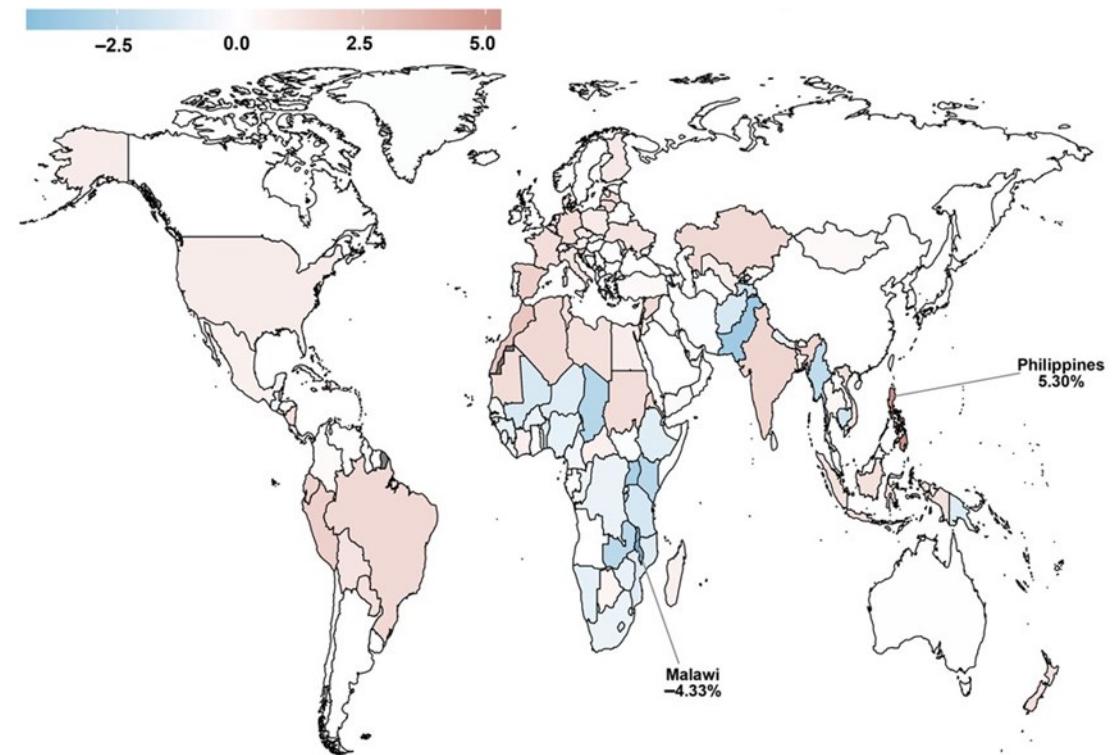
49 mill/ml  
(2018)



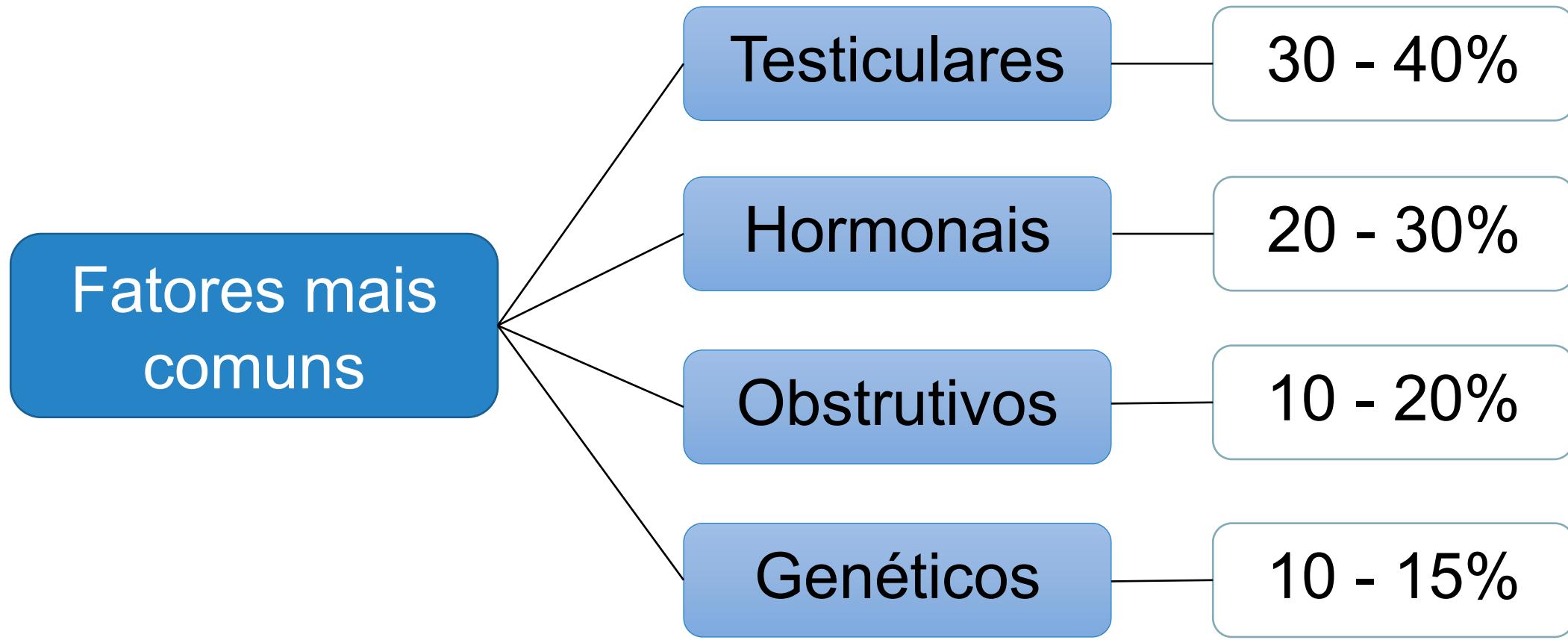
Taxa de prevalência de infertilidade masculina padronizada por idade por 100.000 habitantes, 2021



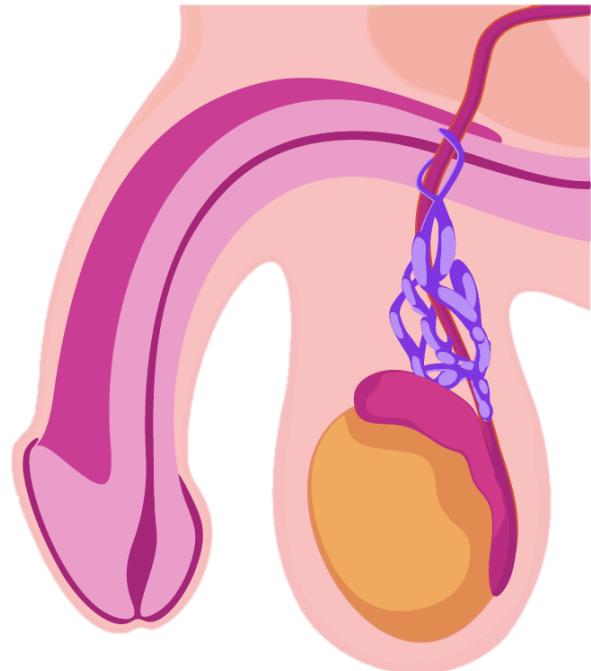
Variação percentual anual estimada na taxa de prevalência de infertilidade masculina, 1990-2021



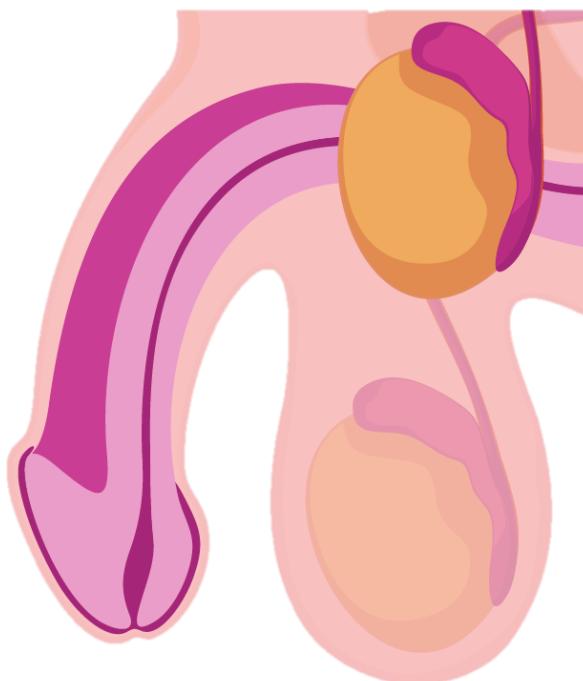
# Causas de infertilidade masculina



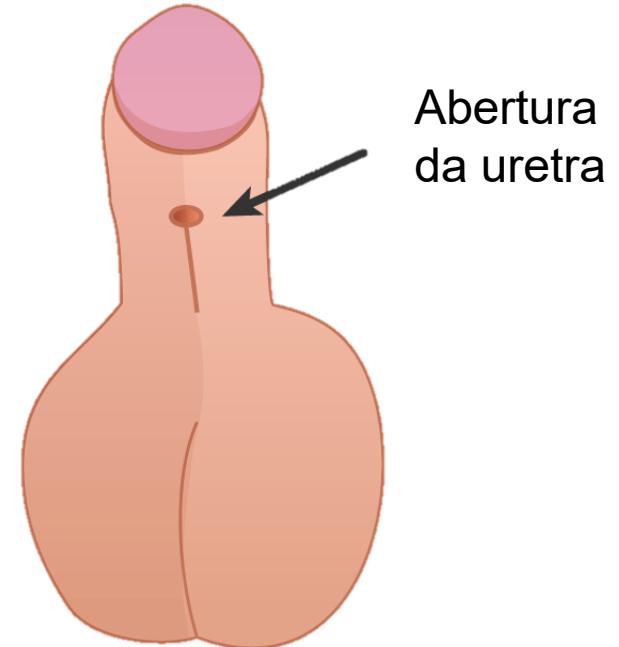
# Fatores testiculares



Varicocele



Criptorquidia



Hipospádia

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

Katz; Teloken; Shoshany, 2017

# Fatores hormonais

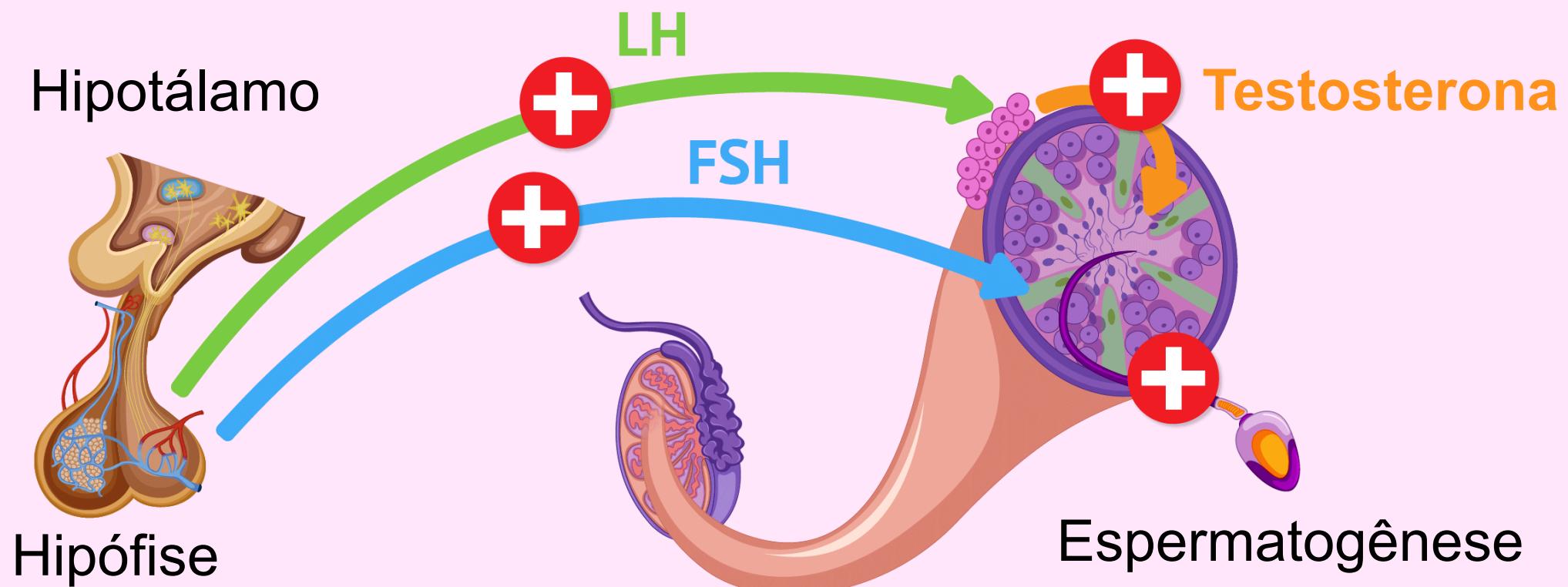
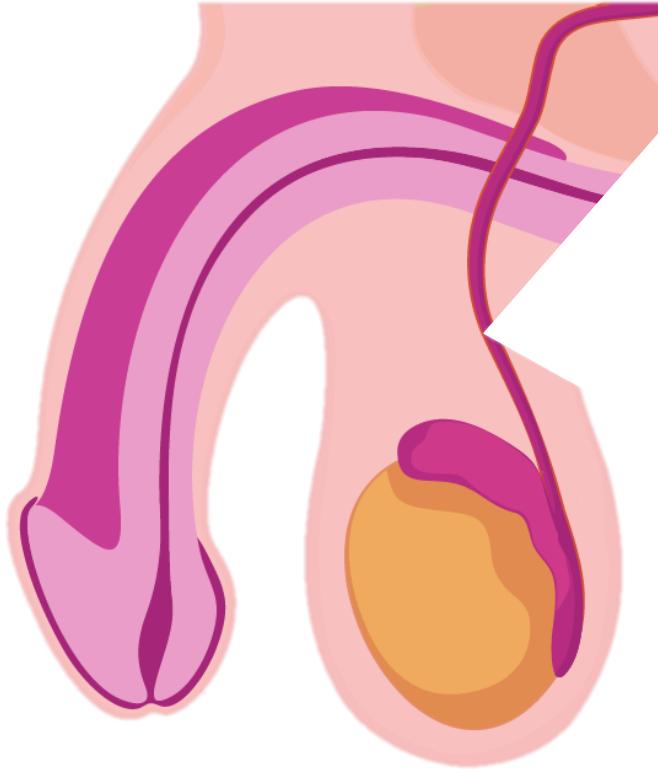
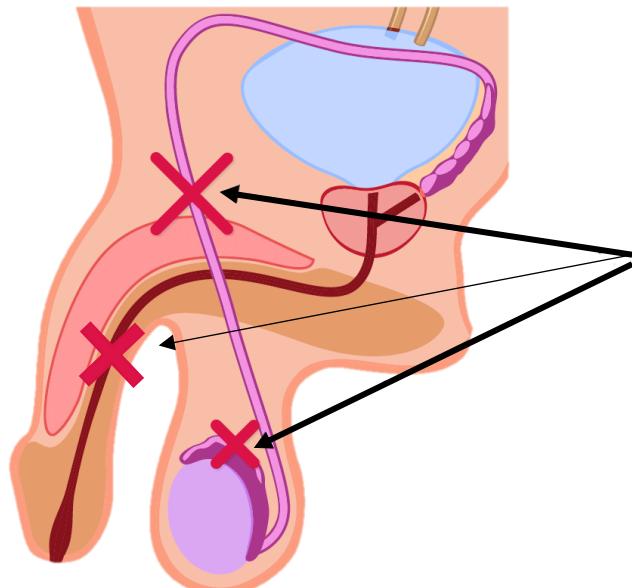


Imagen: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

Ring; Lwin; Köhler, 2016

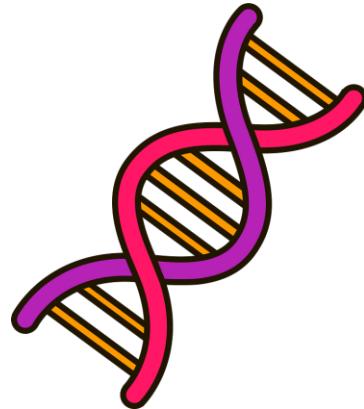
# Fatores obstrutivos



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

Katz; Teloken; Shoshany, 2017

# Fatores genéticos

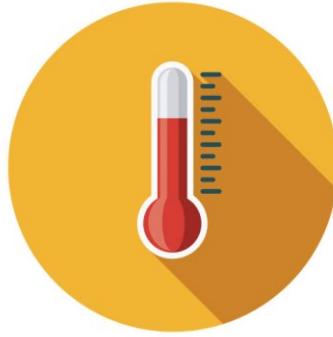


- Anomalias cromossômicas → Síndrome de Klinefelter (47,XXY)
- Microdeleções do cromossomo Y
- Fibrose cística
- Mutação no gene do receptor de andrógeno

# Fatores de risco idiopáticos (1/3 dos casos)



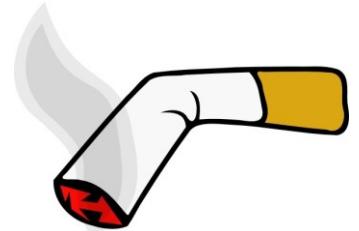
Pesticida



Calor excessivo



Álcool



Fumo



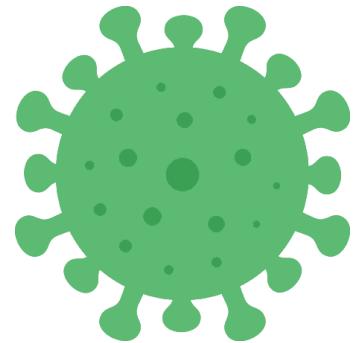
Celular



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



Urinar antes da coleta



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



Secar com papel toalha



**NÃO** utilizar lubrificante  
ou preservativo



Coletar por masturbação  
**SEM** perda de material



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 seminogelinhas 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 e aspecto*

- 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



Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

## *Tempo de liquefação e aspecto*

- 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

Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

*Volume*



Hipospermia  
 $< 1,4\text{ml}$



Normal  
 $1,4\text{ml a } 5\text{ml}$



Hiperespermia  
 $> 5\text{ml}$

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

WHO, 2021

- Volume normal: 1,4ml a 5ml
- Hipospermia: volume menor que 1,4ml
  - Insuficiência ou ausência de abstinência sexual
  - Insuficiência vesicular (Clamydia 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*

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

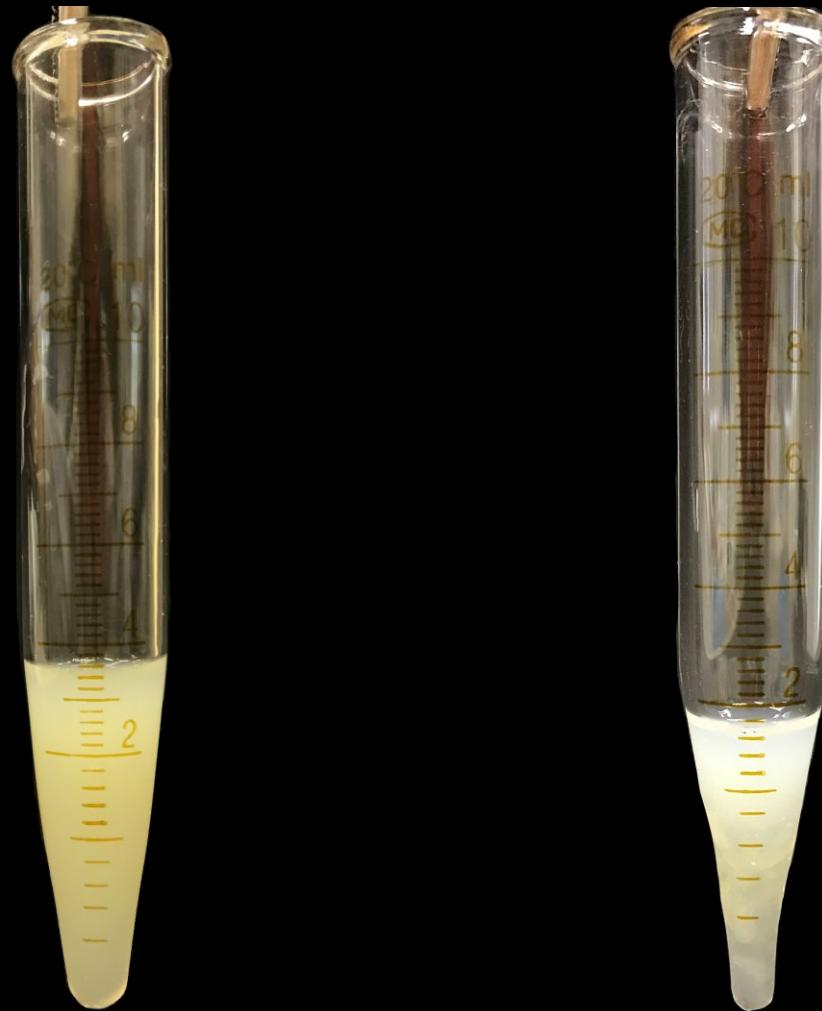


Imagen: LACIT – UFSC

*Cor*



Branco  
opalescente

Amarelo

Âmbar

Vermelho

Castanho

# Viscosidade

Normal → Fio até 2 cm

Viscosidade aumentada → Fio superior a 2 cm



Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

# pH

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

Valor Normal → 7,2 a 8,0

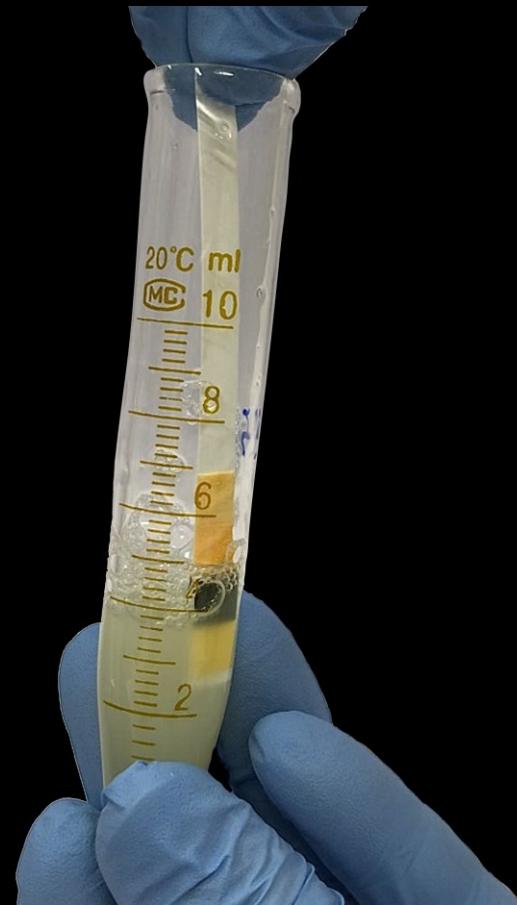


Imagen: LACIT – UFSC

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<sub>2</sub>, 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 hemárias
- Morfologia de células germinativas imaturas
- Morfologia dos espermatozoides

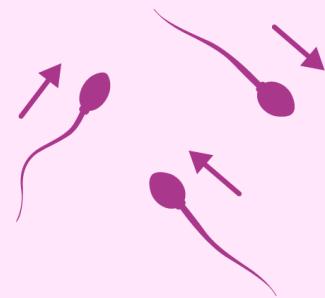
# Motilidade

- 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

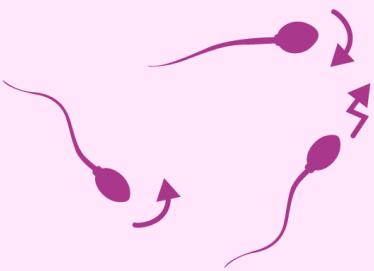
- Se número de espermatozoides por campo variar consideravelmente  
→ indica que amostra não está homogeneizada
- Se número de espermatozoides for muito pequeno → deve centrifugar amostra
- Avaliação da motilidade, deve ser realizada até 60 minutos após coleta, observando espermatozoides em objetiva 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

Espermatozoides avançam



Motilidade  
progressiva  
linear



Motilidade  
progressiva  
não linear

Não avançam



Motilidade não  
progressiva

# *Motilidade*

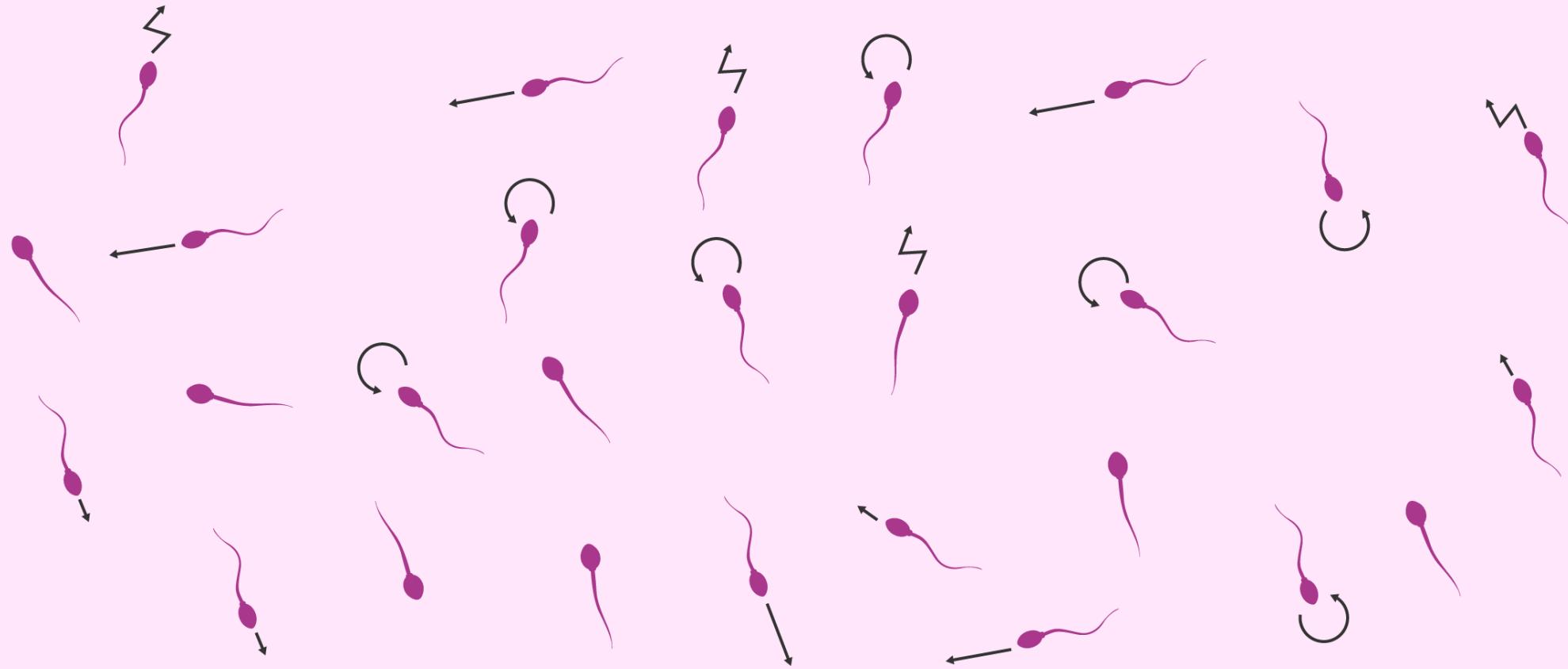


Imagen: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

**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



Imagen: 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

Necrospermia → 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



Imagen: LACIT – UFSC

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

# Concentração

Câmara de Neubauer

10 a 15  
minutos



Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

Concentração

## Câmara de Neubauer

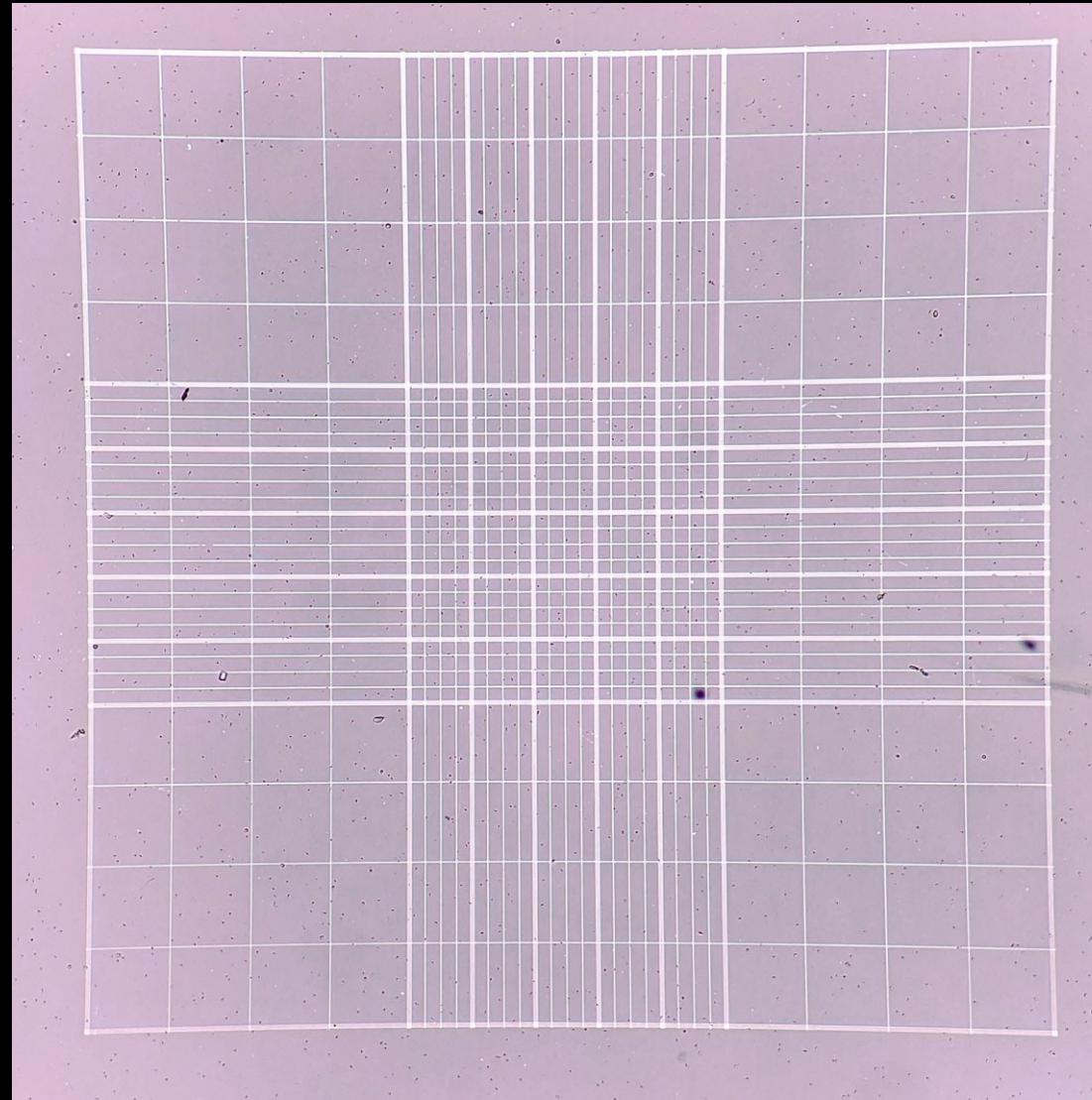


Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

Concentração

## Câmara de Neubauer

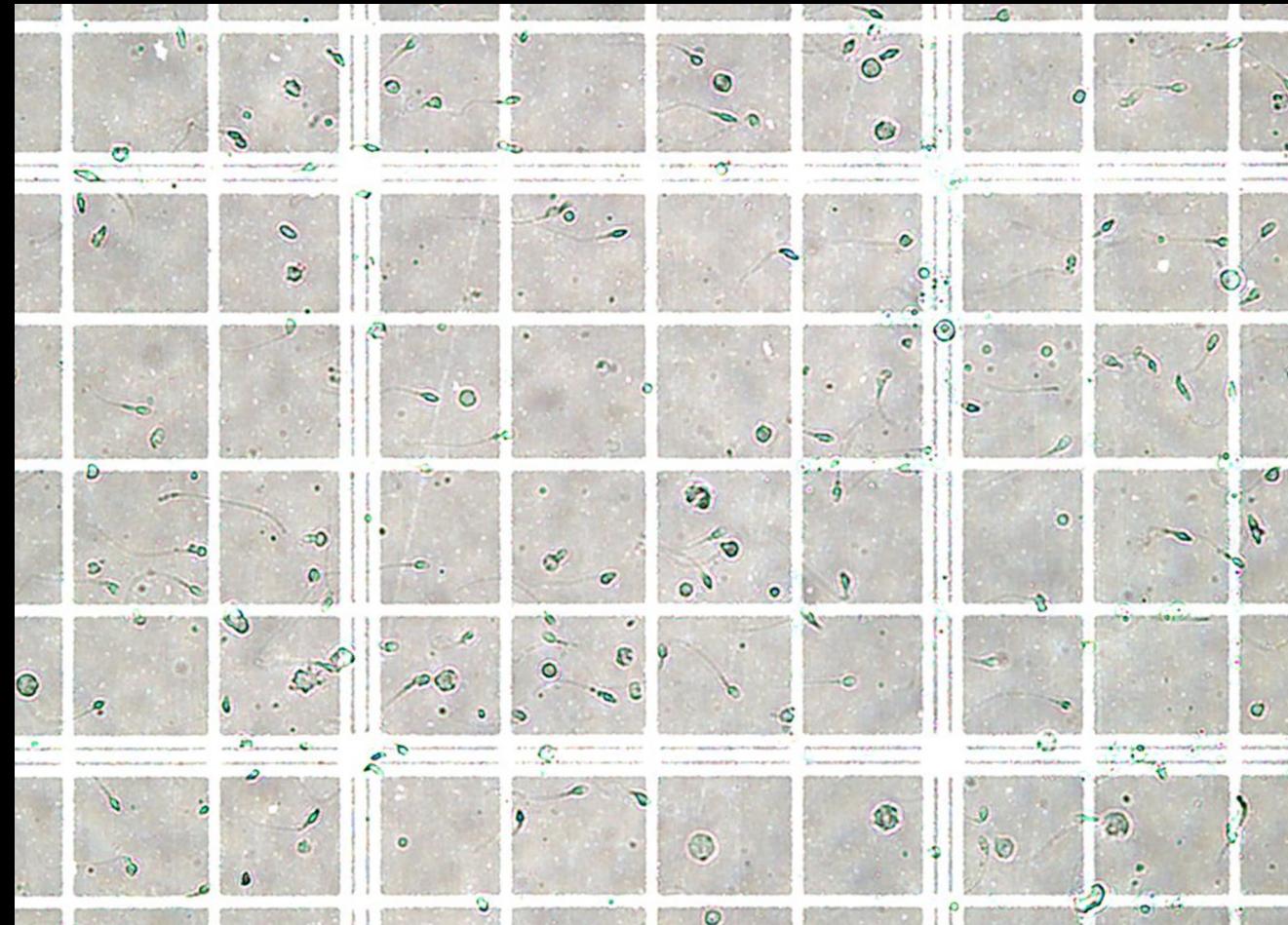
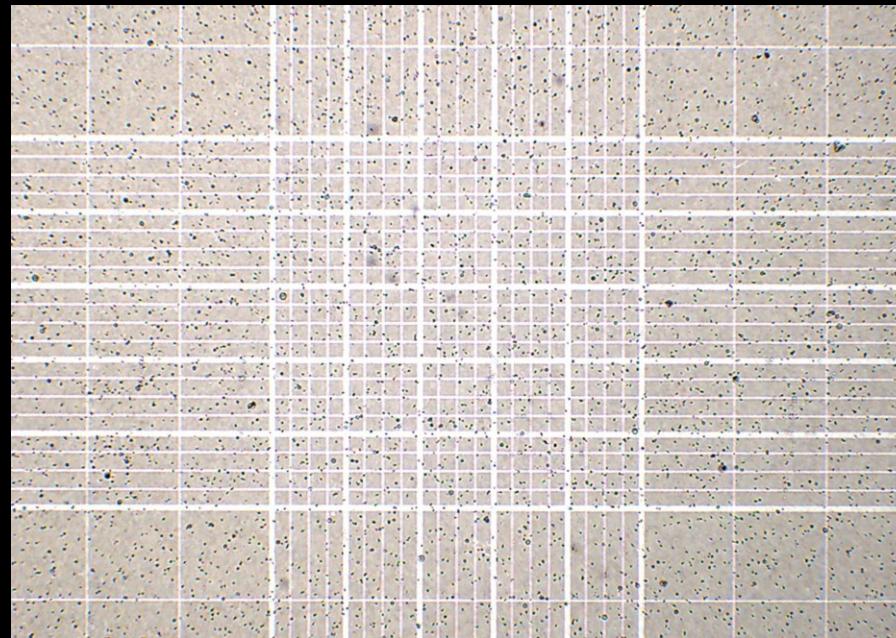


Imagen: LACIT – UFSC

WHO, 2021

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

## Concentração

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

|          | 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   |  |
| Dilution | 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  $\mu$ l de amostra
- Aplicação imediata da lamínula

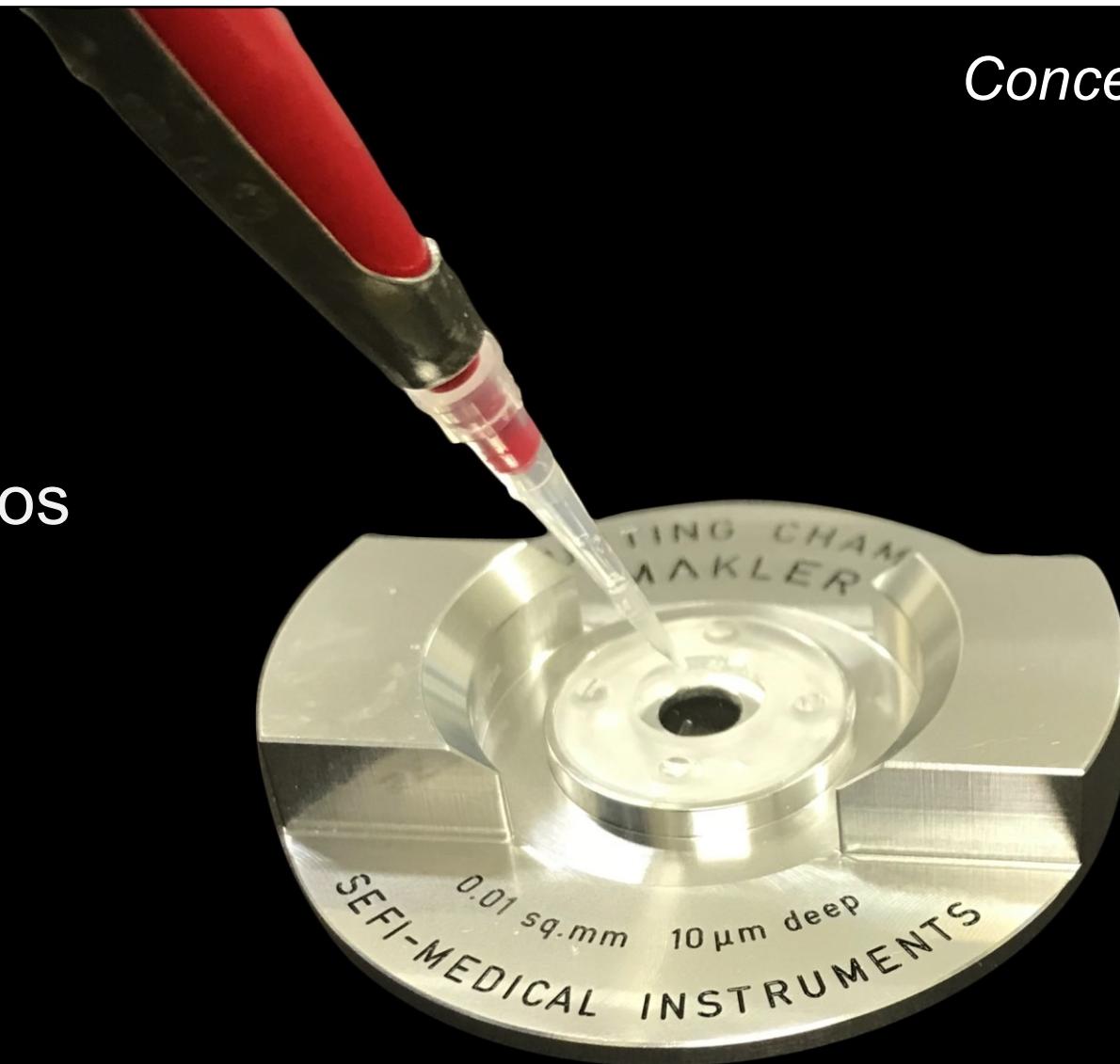


Imagen: LACIT – UFSC

Concentração

## Câmara de Makler

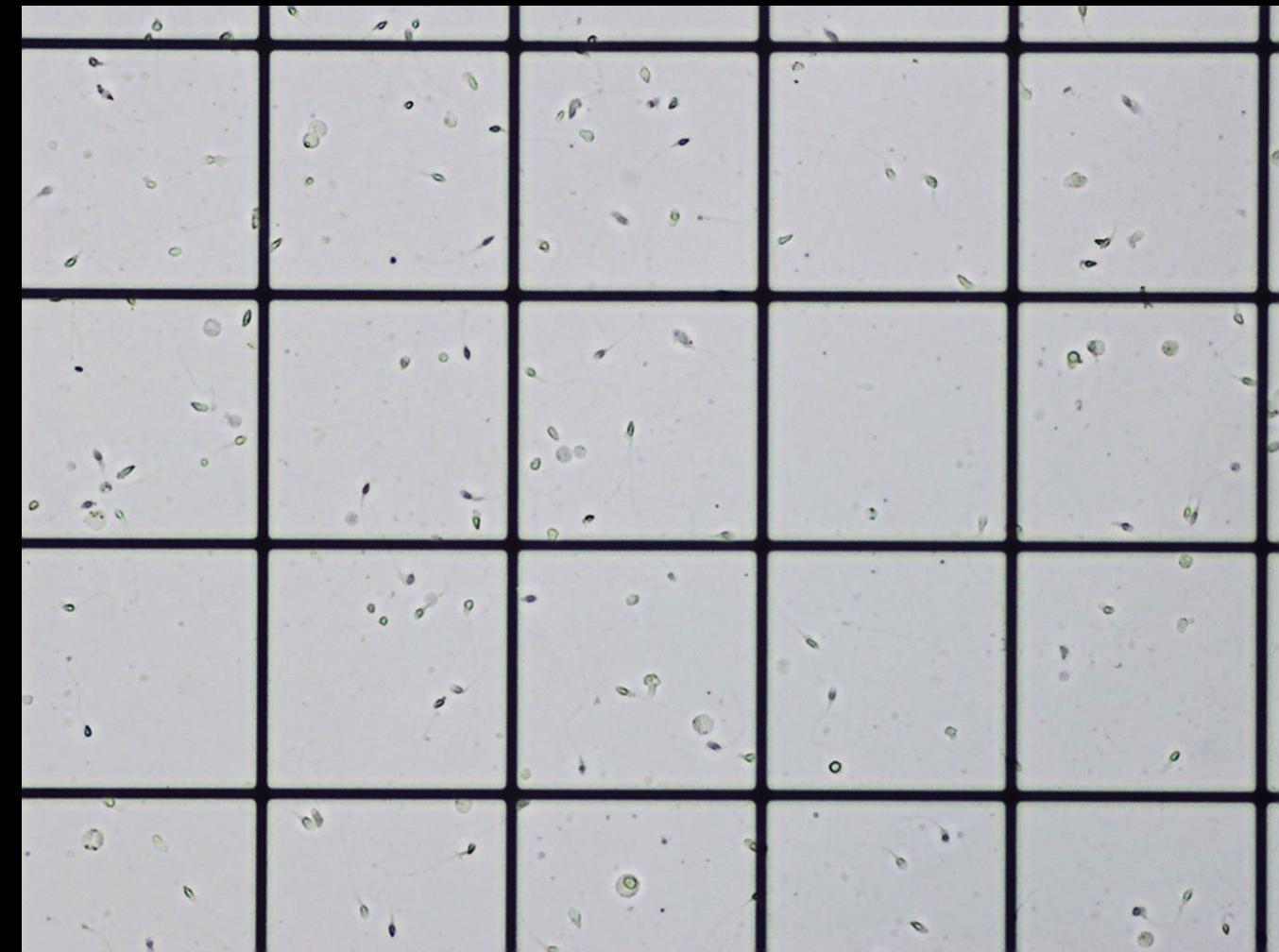
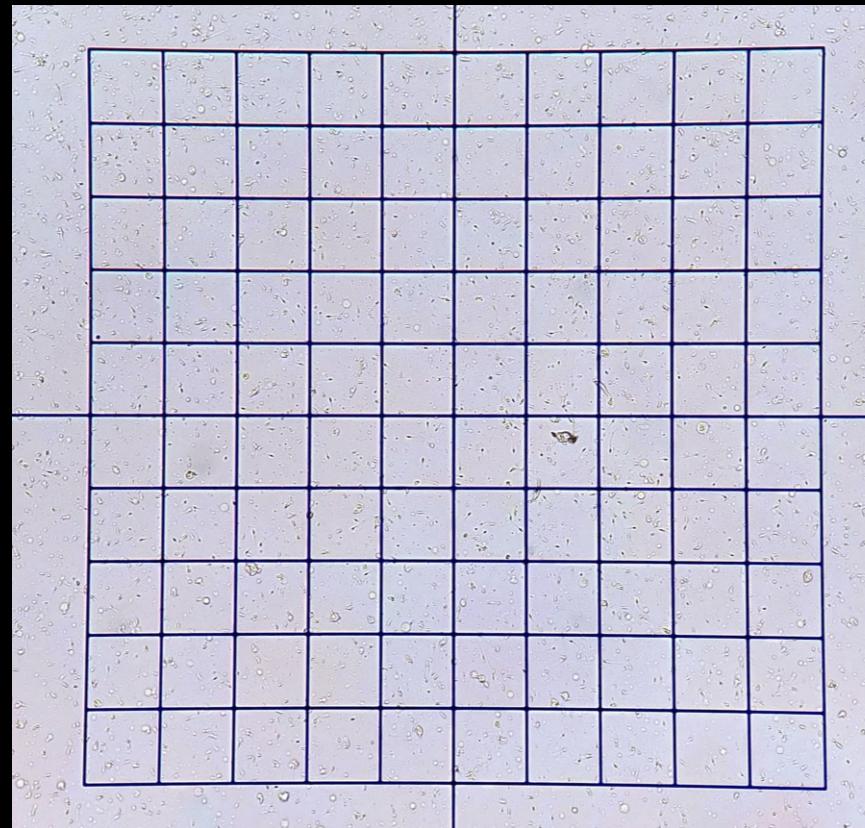


Imagen: LACIT –UFSC

MAKLER, 1980

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

Ane Francyne Costa<sup>1</sup>, Fabiana Botelho de Miranda Onofre<sup>1</sup>, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

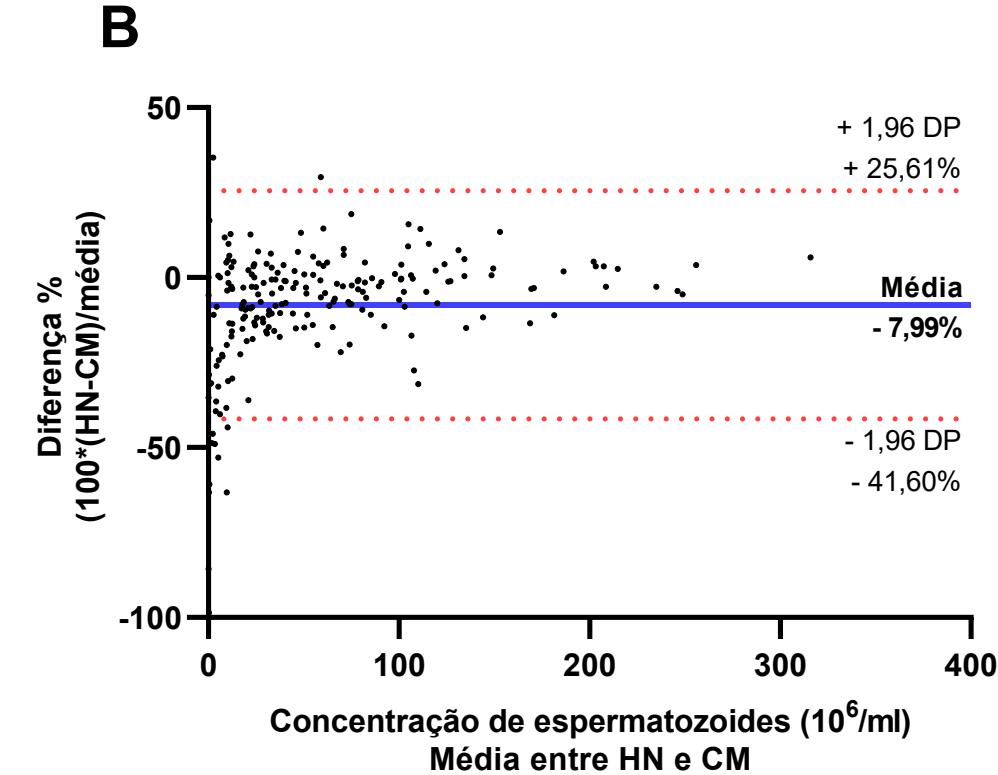
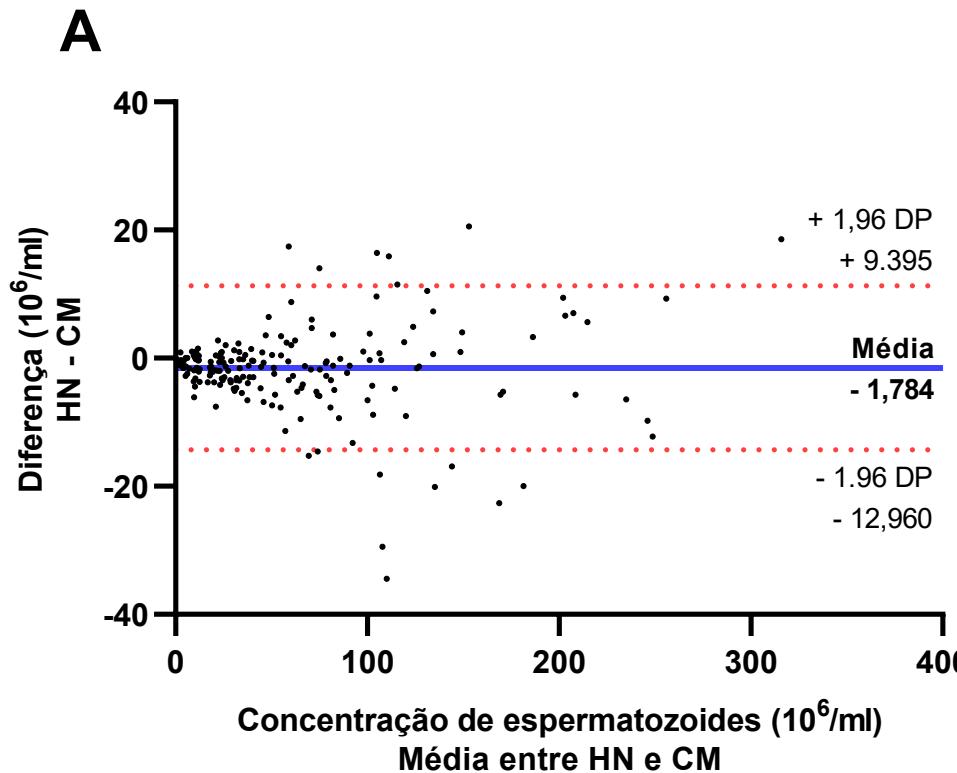
# Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

| 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

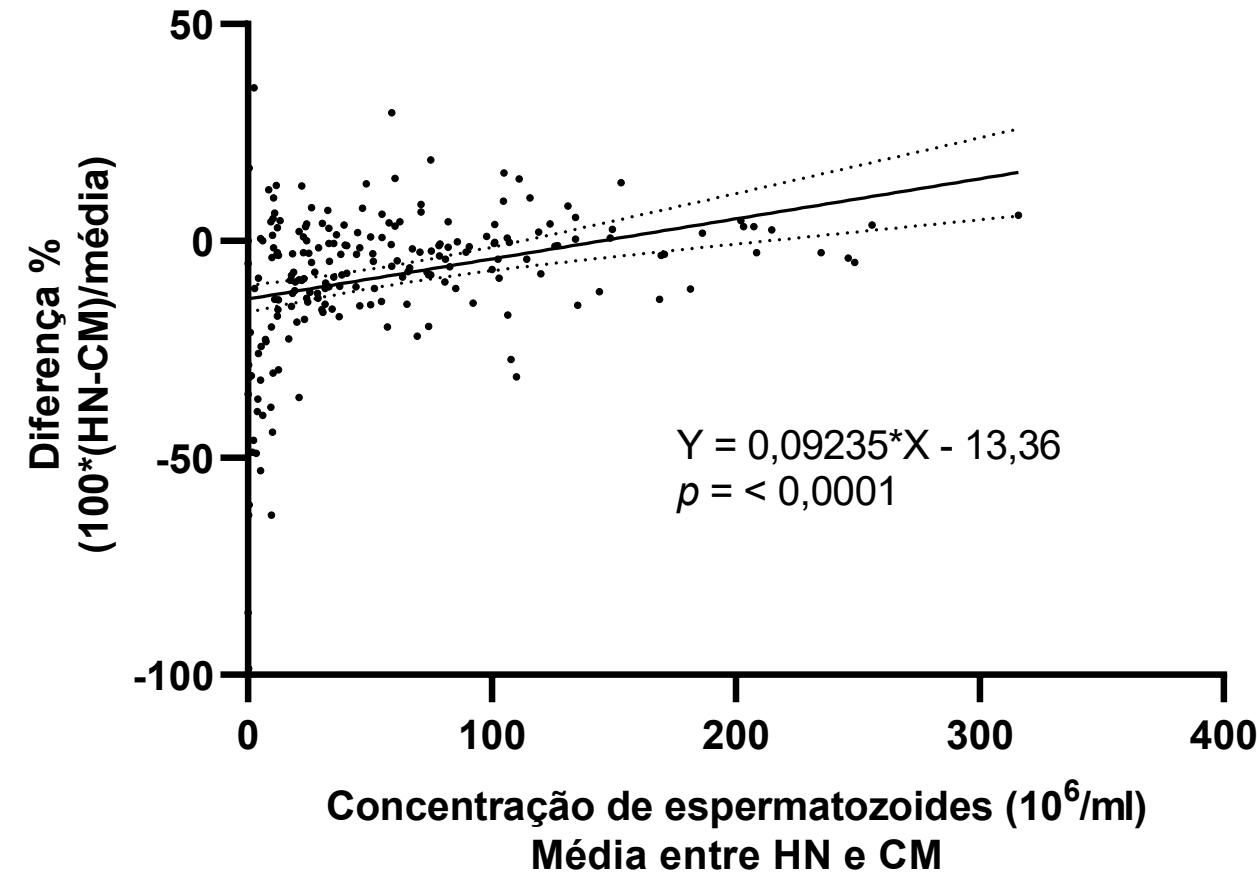


Viés fixo:  $p < 0,0001$

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

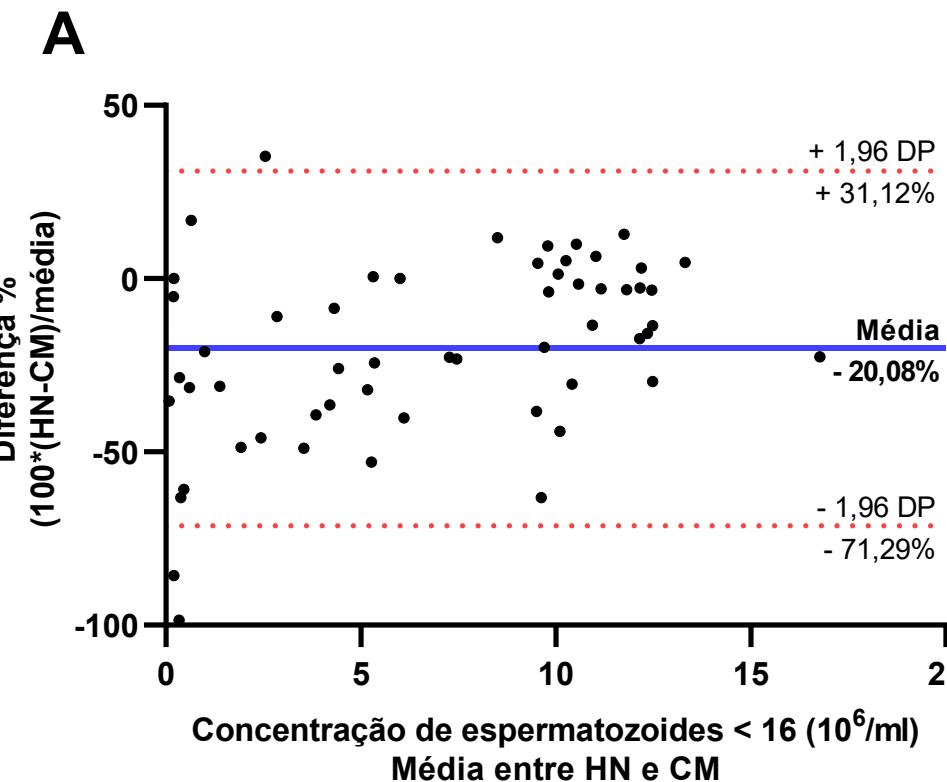
# Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

## Regressão linear

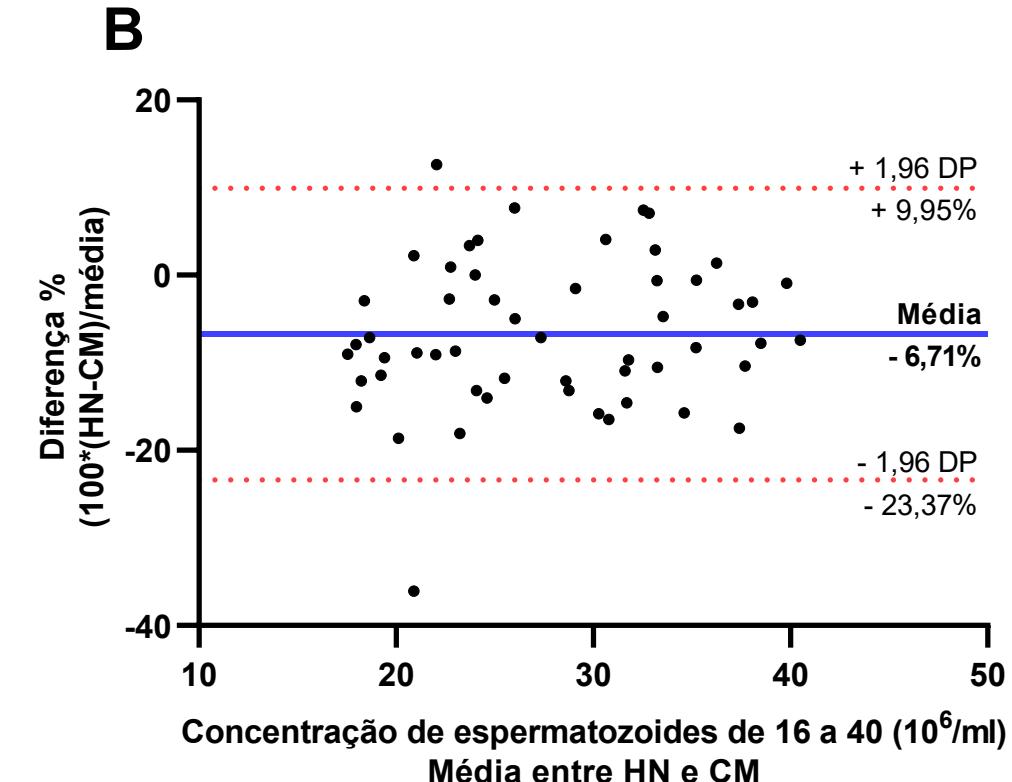


# Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

## Comparação de diferentes faixas de concentração



Viés fixo:  $p < 0,0001$



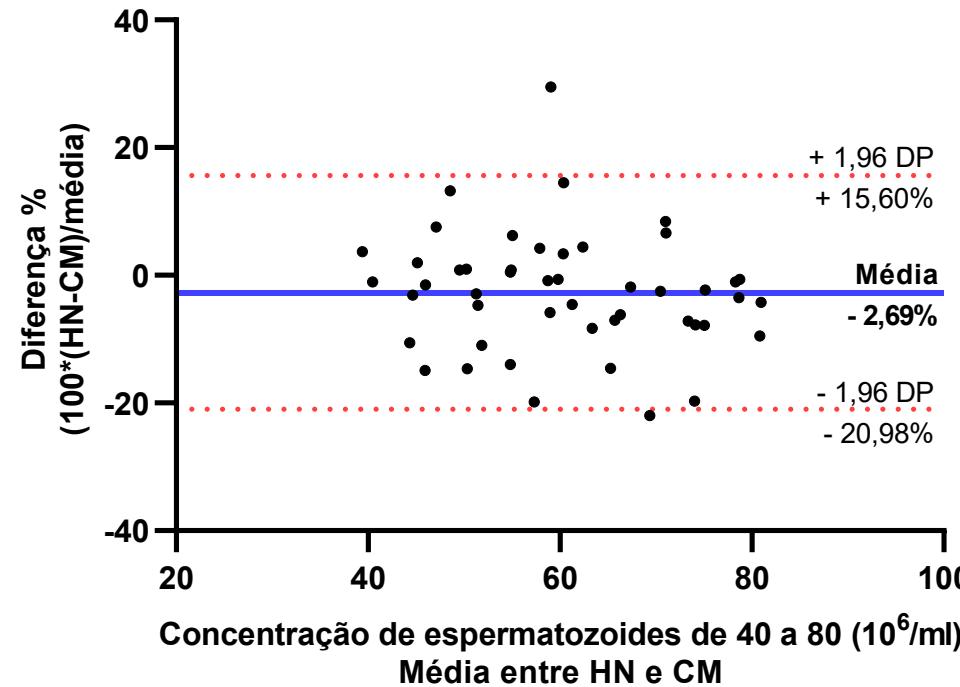
Viés fixo:  $p < 0,0001$

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

# Neubauer x Makler (amostras de sêmen)

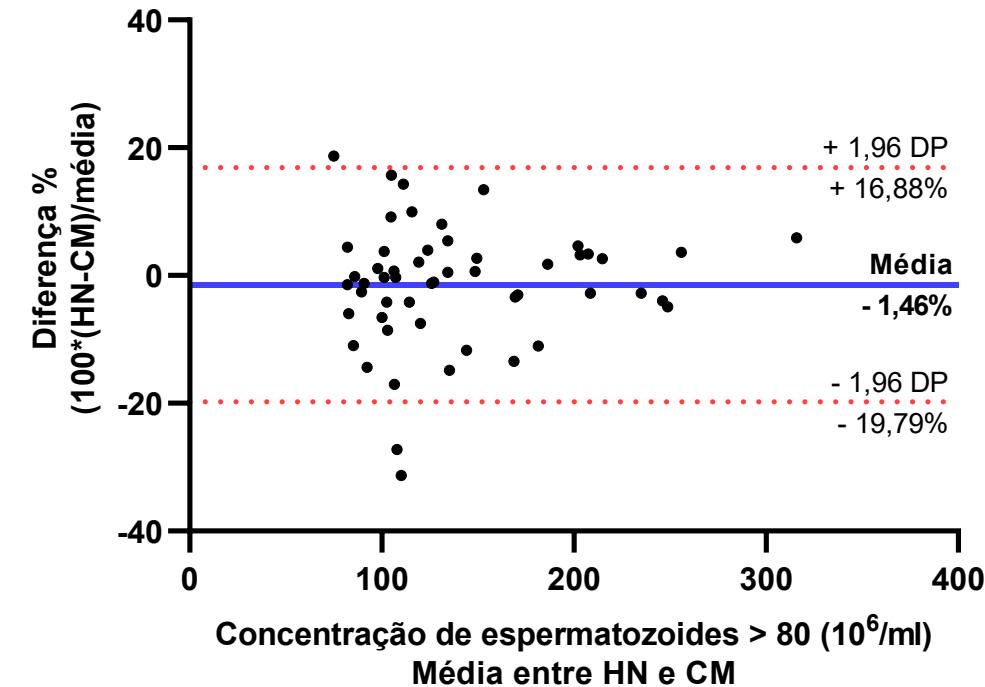
Comparação de diferentes faixas de concentração

C



Viés fixo:  $p = 0,052$

D



Viés fixo:  $p = 0,421$

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

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, agenesias 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*

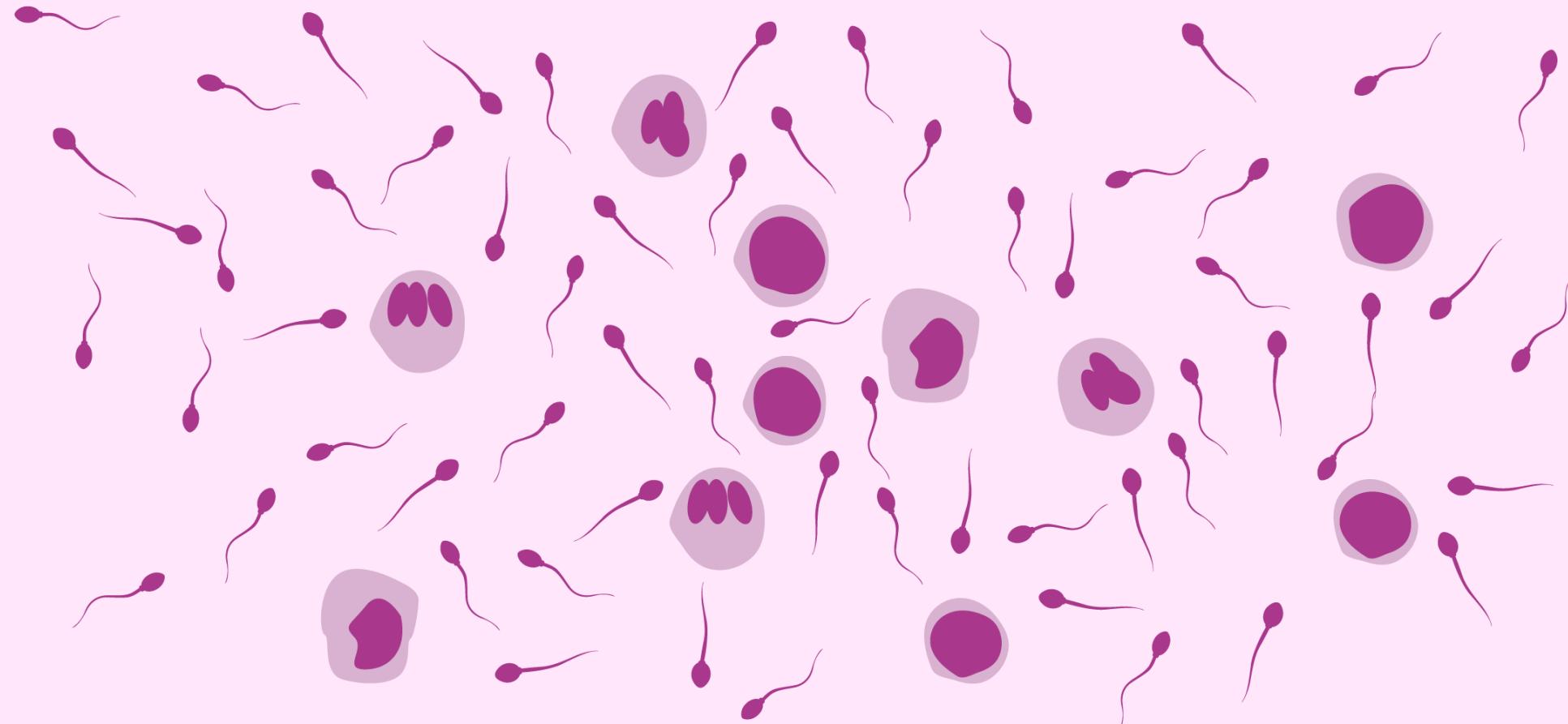
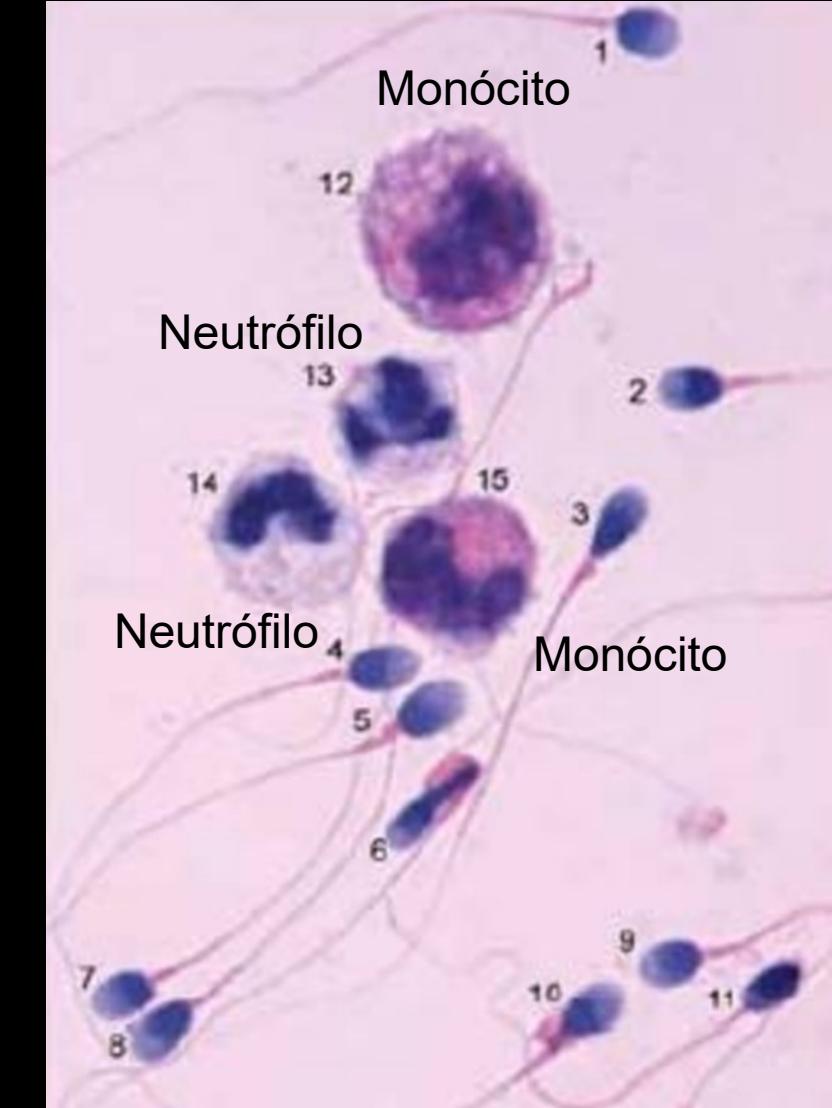
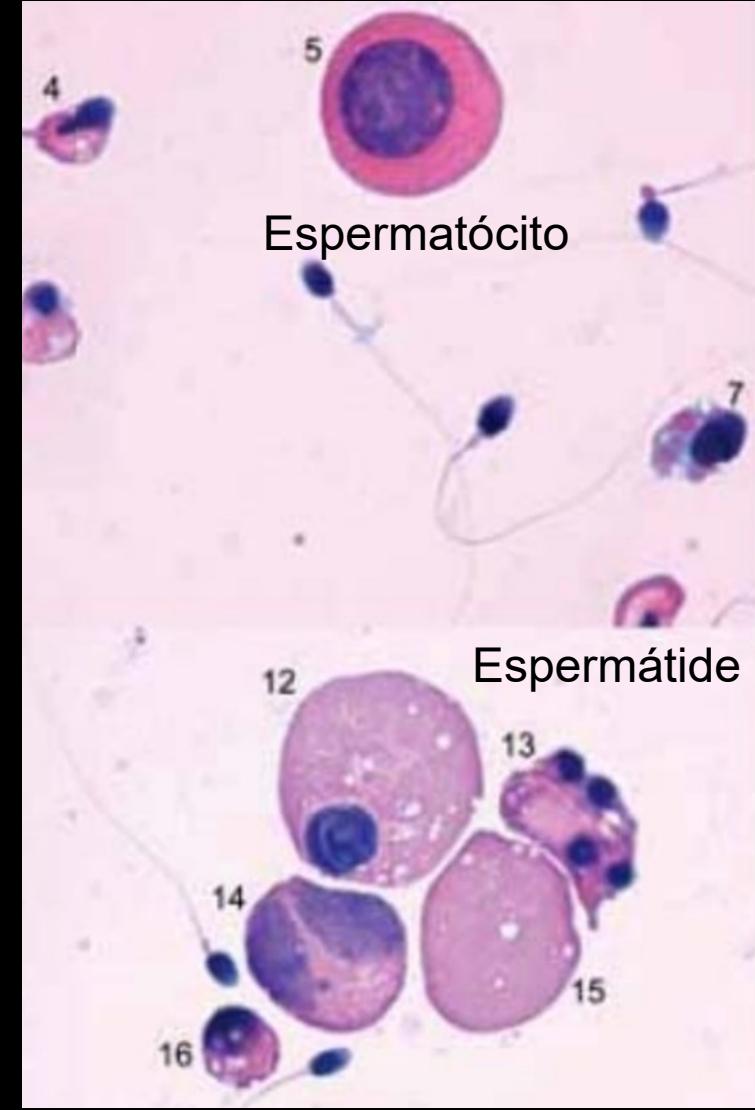
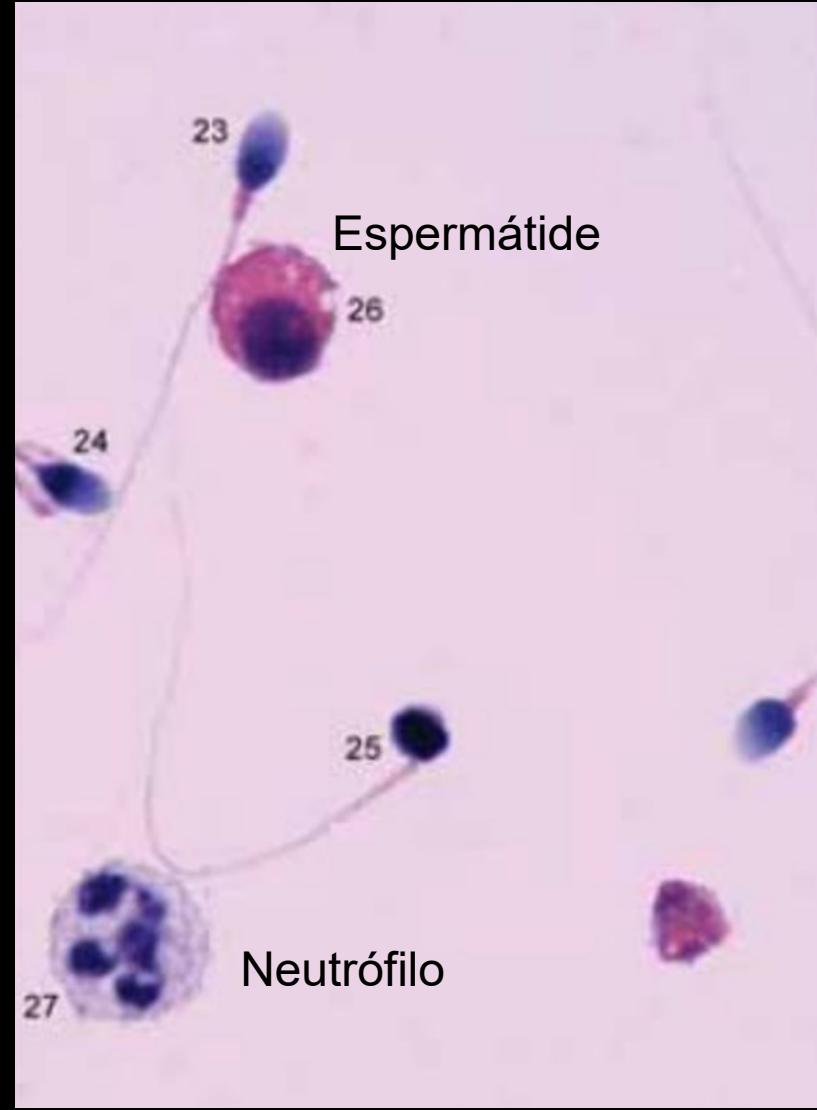


Imagen: <https://www.invitra.com/en/male-sterility/>

## *Células redondas e hemácias*



## *Células redondas e hemácias*



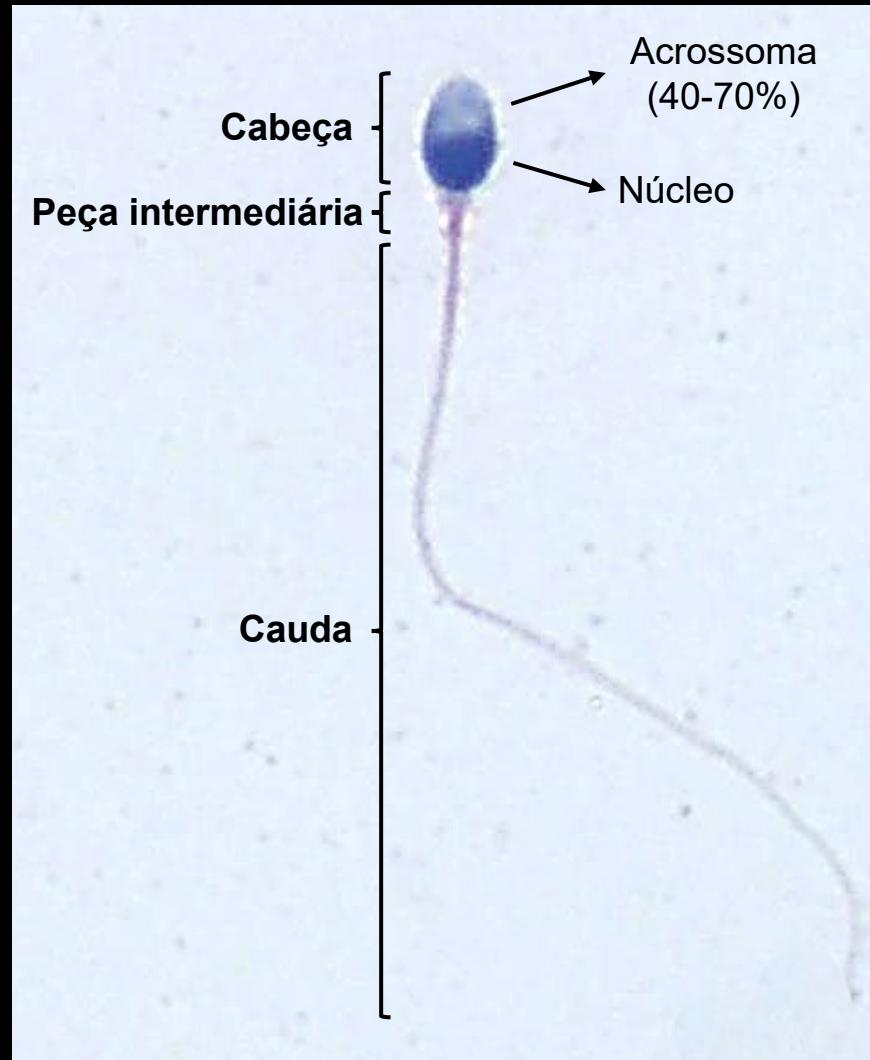
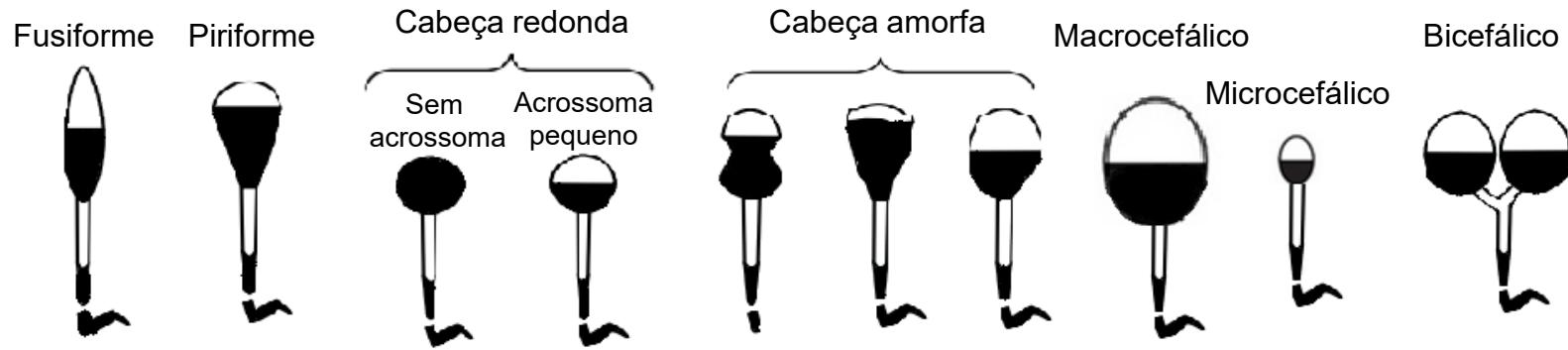


Imagen: LACIT –UFSC

# Morfologia

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

## Anomalias de cabeça



## Anomalias de peça intermediária

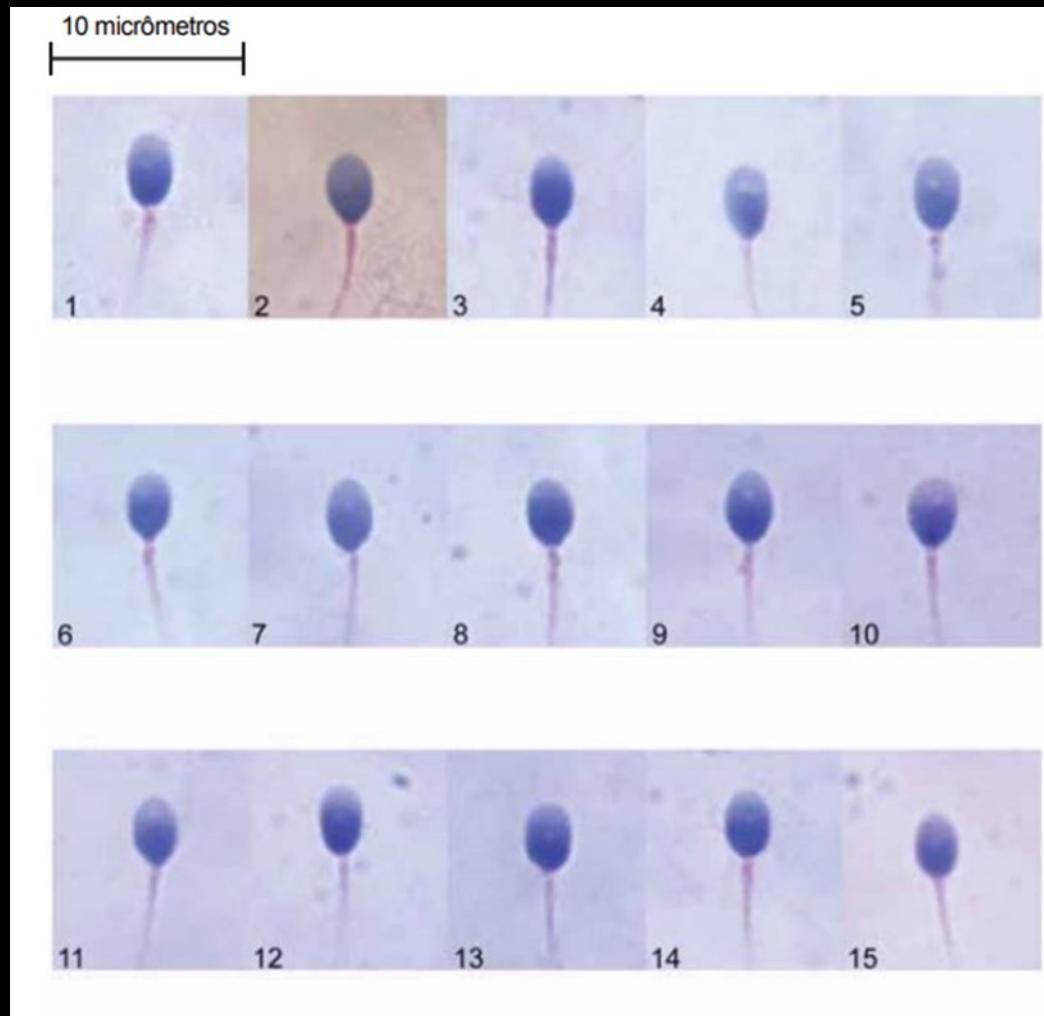
Peça grossa      Peça fina      Excesso de citoplasma residual



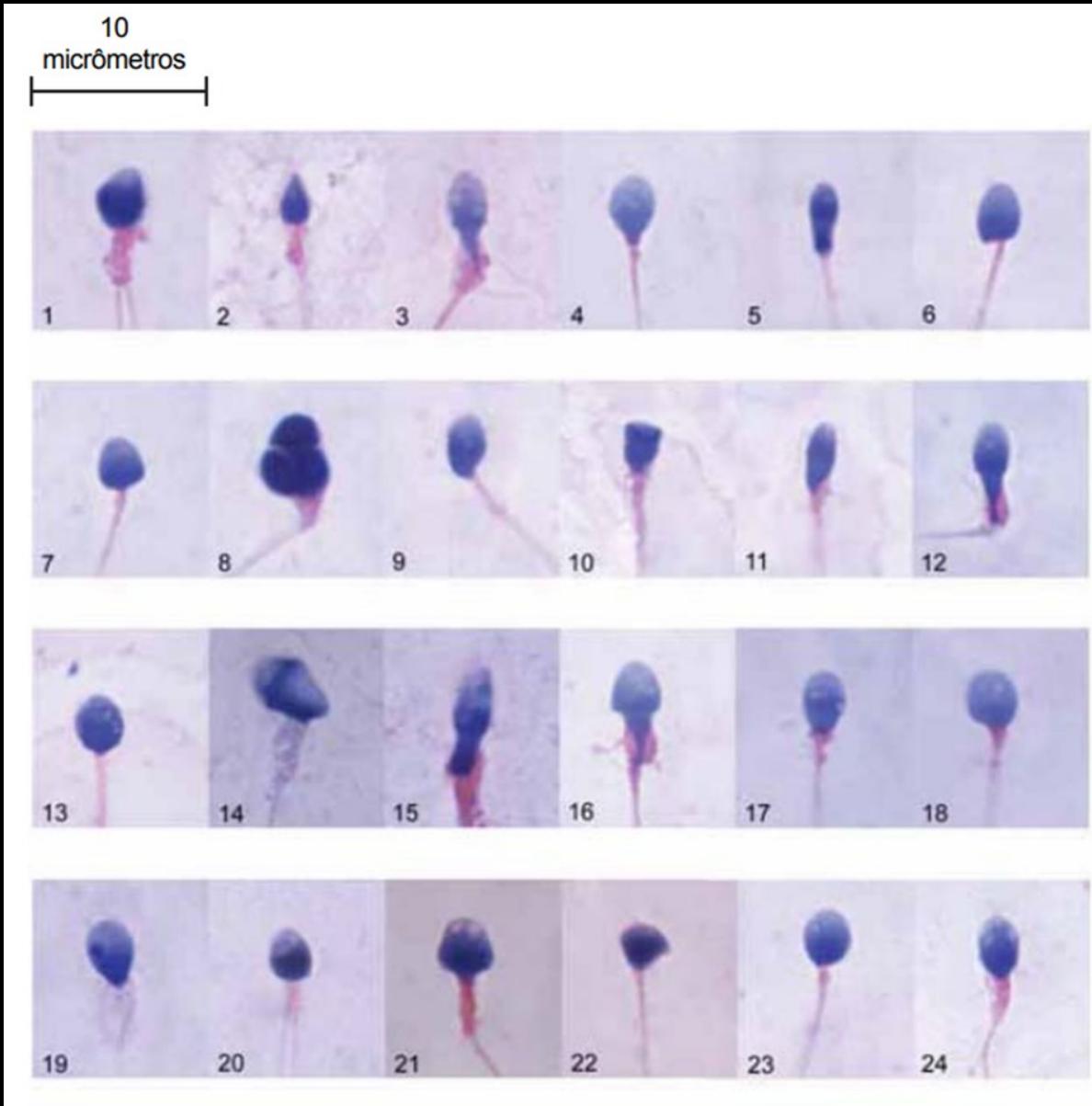
## Anomalias de cauda

Cauda curta      Cauda enrolada      Bicaudal

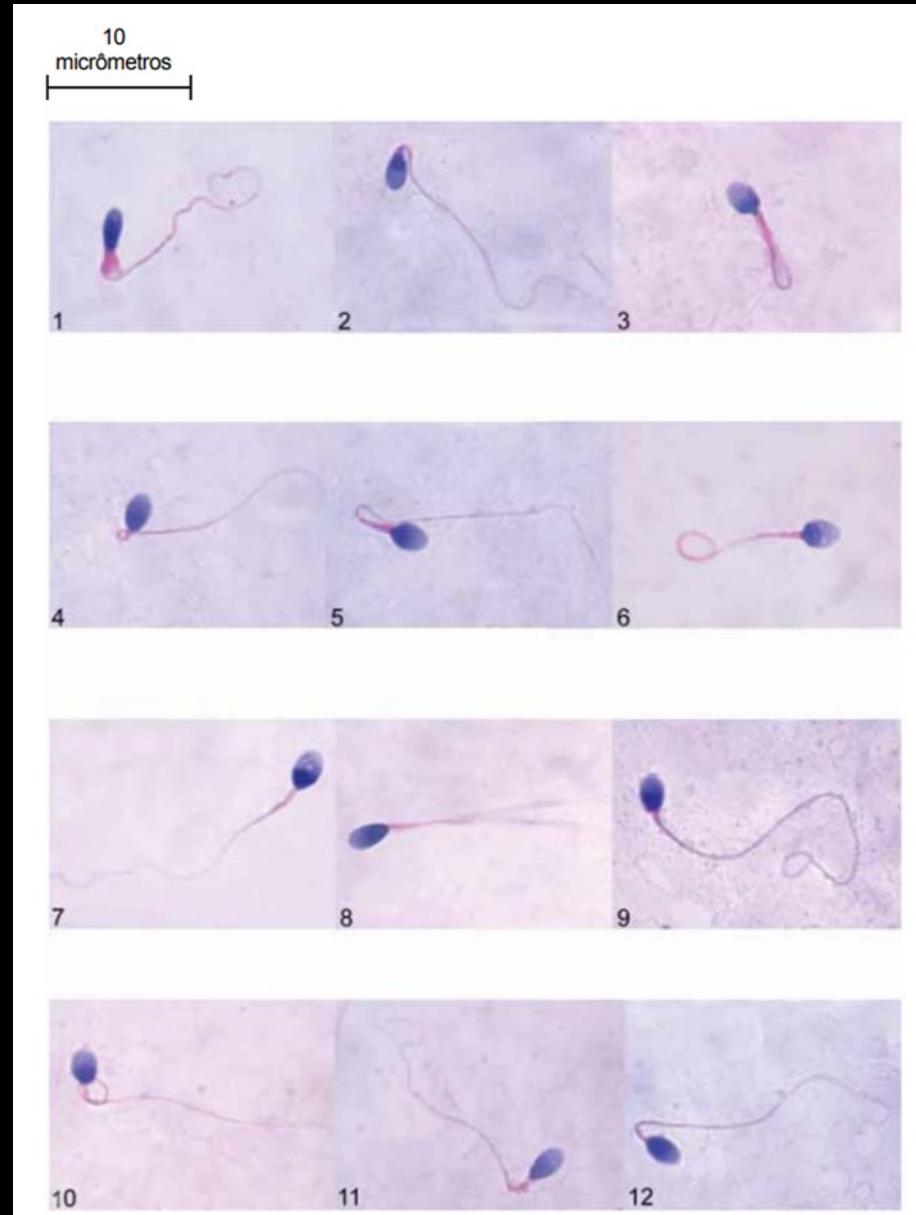




Espermatozoides  
normais



Espermatozoides  
Anormais



## 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 morfológicamente anormal geralmente apresenta múltiplos defeitos

Valor de referência OMS (2010) > 4% normais

Teratospermia: % de espermatozoides normais abaixo dos limites de referência

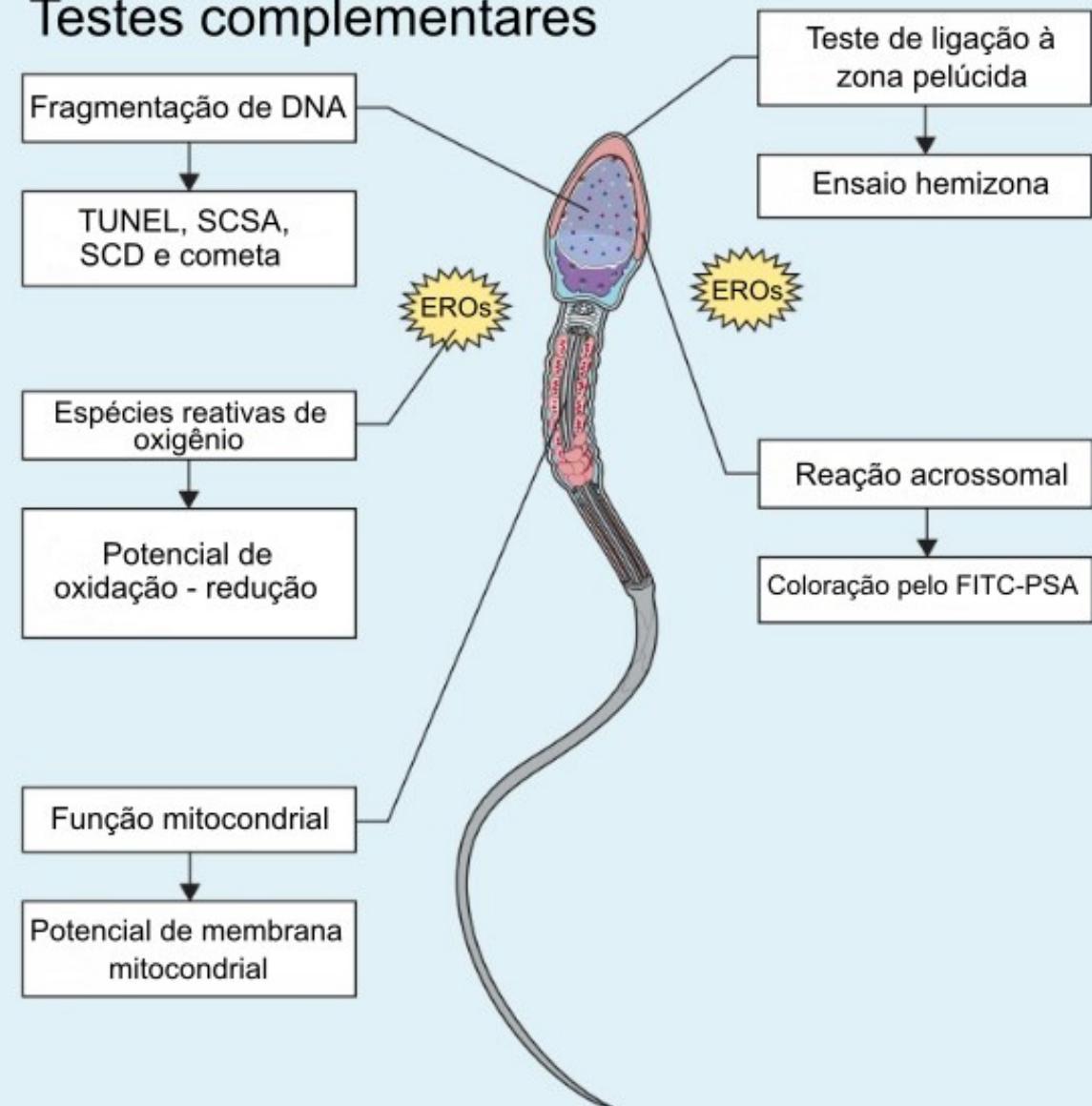
Causas: alterações na temperatura escrotal como varicocele e hidrocele

# Testes complementares

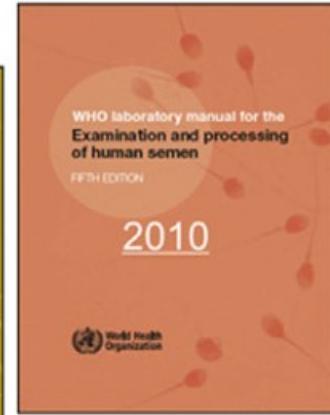
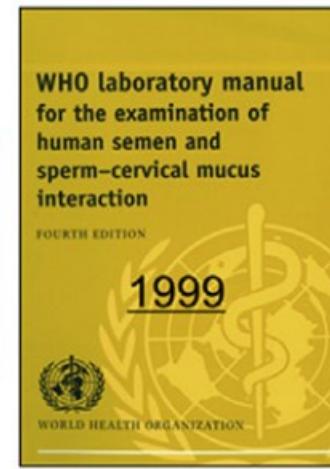
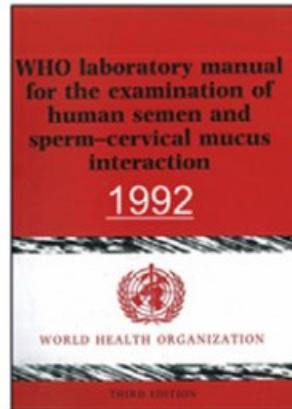
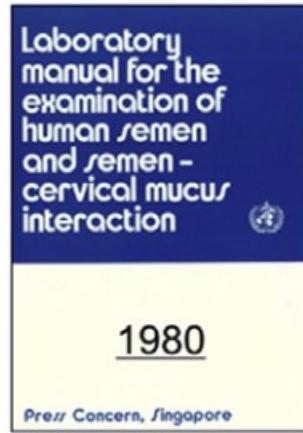
- Testes de função espermática
- Elucidar problemas não identificados no espermograma que podem ser potenciais causas da infertilidade masculina

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.

## Testes complementares



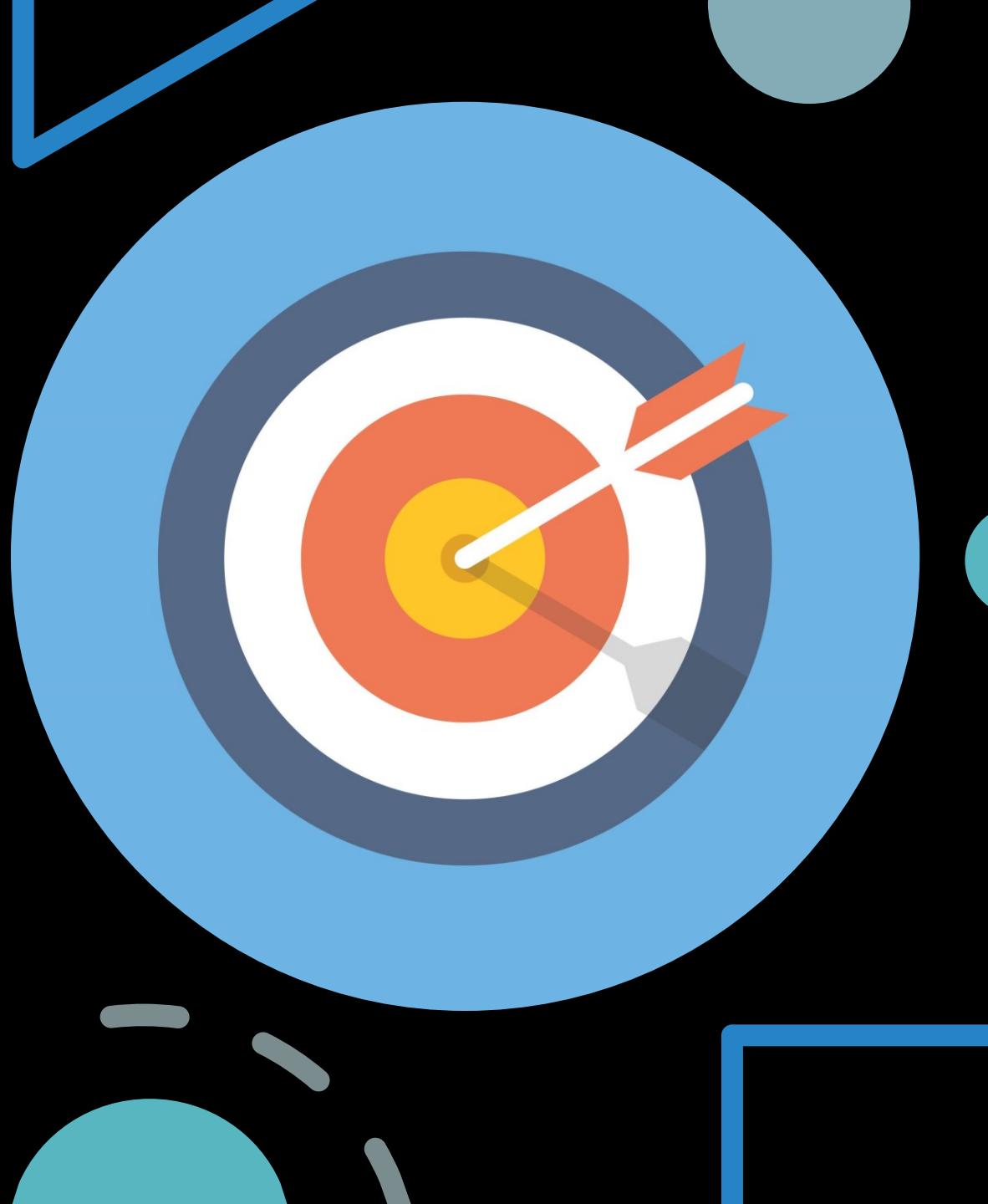
# Edições do manual da OMS para exame e processamento de sêmen humano



# 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    | 2,5 | 5,0 | (IC 95%)    | Percentil |     |     |     |     |     |      |
|--|------|-----|-----|-------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|  |      |     |     |             | 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 ( $10^6/\text{ml}$ )      | 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

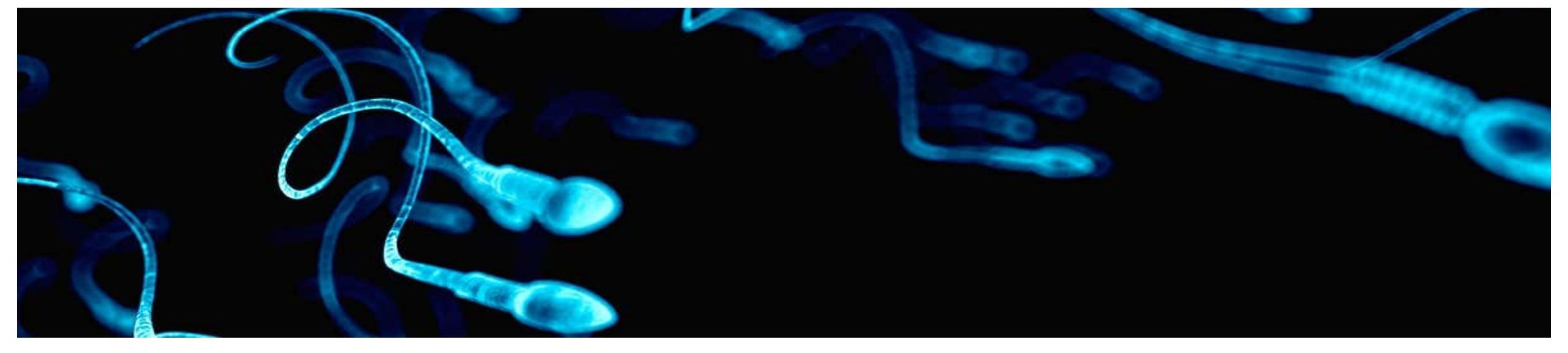
Controle externo: avaliar a acurácia dos resultados do laboratório em comparação com um padrão de referência externo e a consistência com outros laboratórios

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!



# 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