

Manual de laboratório da OMS

Exame e processamento do sêmen humano

QUINTA EDIÇÃO

Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento do sêmen humano - 5ª ed.

Publicado pela Organização Mundial de Saúde em 2010 sob o título “ WHO laboratory manual for the examination and processing of human sêmen - 5th ed.”

A **Organização Mundial da Saúde** concedeu direitos de tradução e publicação de uma edição em português para o **Programa Nacional de Controle de Qualidade**, que é o único responsável pela qualidade e fidelidade da versão em português.

No caso de qualquer inconsistência entre as versões em inglês e português, a versão original em inglês será a versão obrigatória e autêntica.

© Programa Nacional de Controle de Qualidade – 2018

Programa Nacional de Controle de Qualidade - 2018.

Tradução: Global Translation

Revisão técnica:

Assessor Dr. Orildo dos Santos Pereira

Revisão ortográfica e visualização:

Superintendente: Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães

Diretor de Administração: Dr. José Abol Corrêa

CONTEÚDO

Agradecimentos	xiv
Siglas e abreviaturas usadas neste manual	vi

Capítulo 1	Antecedentes	1
1.1	Introdução	1
1.2	A quinta edição	1
1.3	Alcance do manual	3

PARTE I. ANÁLISE DO SÊMEN

Capítulo 2	Procedimentos padrão	5
2.1	Introdução	5
2.2	Coleta da amostra	8
2.2.1	Preparação	8
2.2.2	Coleta de sêmen para fins de diagnóstico ou pesquisa	9
2.2.3	Coleta estéril de sêmen para reprodução assistida	9
2.2.4	Coleta estéril de sêmen para análise microbiológica	9
2.2.5	Coleta de sêmen em casa	10
2.2.6	Coleta de sêmen com preservativo	10
2.2.7	Manipulação segura de amostras	11
2.3	Exame macroscópico inicial	11
2.3.1	Liquefação	11
2.3.2	Viscosidade do sêmen	12
2.3.3	Aparência do ejaculado	13
2.3.4	Volume do sêmen	13
2.3.5	pH do sêmen	14
2.4	Investigação microscópica inicial	15
2.4.1	Mistura completa e amostragem representativa do sêmen	15
2.4.2	Fazendo uma preparação úmida	15
2.4.3	Agregação de espermatozoides	16
2.4.4	Aglutinação de espermatozoides	17
2.4.5	Elementos celulares que não sejam espermatozoides	18
2.5	Motilidade espermática	19
2.5.1	Categorias de movimento de esperma	19
2.5.2	Preparando e avaliando uma amostra para motilidade	20
2.5.3	Exemplos práticos	22
2.5.4	Limite inferior de referência	23
2.6	Vitalidade do esperma	23
2.6.1	Teste de vitalidade usando eosina-nigrosina	24
2.6.2	Teste de vitalidade usando apenas eosina	26
2.6.3	Teste de vitalidade usando inchaço hipo-osmótico	27
2.7	Número de espermatozoides	29
2.7.1	Tipos de câmara de contagem	30
2.7.2	O hemocitômetro de Neubauer melhorado	31
2.7.3	Usando a grade do hemocitômetro	32
2.7.4	Cuidado da câmara de contagem	32
2.7.5	Fixador para diluir o sêmen	33

2.7.6	A importância de contar suficientes espermatozoides	33
2.8	Procedimento de contagem de rotina	34
2.8.1	Determinar a diluição necessária	34
2.8.2	Preparar as diluições e carregar as câmaras do hemocítmetro	36
2.8.3	Avaliação do número de espermatozoides nas câmaras de contagem	37
2.8.4	Cálculo da concentração de espermatozoides no sêmen	39
2.8.5	Exemplos práticos	39
2.8.6	Limite inferior de referência para a concentração de espermatozoides	40
2.8.7	Cálculo do número total de espermatozoides no ejaculado	40
2.8.8	Limite inferior de referência para o número total de espermatozoides	40
2.9	Números espermáticos baixos: criptozoospermia e suspeita de azoospermia	40
2.10	Quando uma avaliação precisa de um baixo número de espermatozoides não é necessária	41
2.10.1	Não realizar nenhuma ação	41
2.10.2	Exame de amostras centrifugadas para detectar espermatozoides	41
2.10.3	Exame de amostras não centrifugadas para detectar espermatozoides móveis	42
2.11	Quando uma avaliação precisa de um baixo número de espermatozoides é necessária	43
2.11.1	Avaliação do baixo número de espermatozoides em toda a câmara melhorada de Neubauer (microscopia de fase com contraste)	44
2.11.2	Avaliação do baixo número de espermatozoides em lâminas descartáveis de grande volume (microscopia de fluorescência)	48
2.12	Contagem de células não espermáticas	53
2.12.1	Cálculo da concentração de células redondas no sêmen	53
2.12.2	Sensibilidade do método	53
2.12.3	Exemplos práticos	53
2.13	Morfologia espermática	55
2.13.1	O conceito de espermatozoides normais	55
2.13.2	Preparação de esfregaços de sêmen	56
2.14	Métodos de coloração	60
2.14.1	Fixação tradicional e coloração sequencial	60
2.14.2	Procedimento de coloração de Papanicolaou para morfologia espermática	61
2.14.3	Procedimento de coloração Shorr para morfologia espermática	63
2.14.4	Procedimento de coloração rápida para morfologia espermática	64
2.15	Examinando a preparação corada	65
2.15.1	Classificação da morfologia normal dos espermatozoides	65
2.15.2	Classificação da morfologia anormal dos espermatozoides	66
2.16	Placas morfológicas 1–14	70
2.17	Analisando a morfologia do esperma	108
2.17.1	Avaliação da morfologia dos espermatozoides normais	108
2.17.2	Exemplos práticos	109
2.17.3	Limite inferior de referência	109
2.17.4	Avaliação da morfologia dos espermatozoides anormais	109
2.17.5	Exemplo prático	110
2.17.6	Avaliação dos defeitos espermáticos específicos	110
2.18	Avaliação de leucócitos no sêmen	111
2.18.1	Coloração de peroxidase celular usando orto-toluidina	111
2.19	Avaliação de células germinativas imaturas no sêmen	116
2.20	Teste para revestimento de anticorpos para espermatozoides	116
2.20.1	O teste de reação mista de antiglobulina	117
2.20.2	Teste direto imunobead (imunoesferas)	119
2.20.3	Teste indireto imunobead (imunoesferas)	122

Capítulo 3	Procedimentos Opcionais	124
3.1	Índices de múltiplos defeitos espermáticos	124
3.1.1	Cálculo de índices de múltiplos defeitos morfológicos	124
3.1.2	Exemplo prático	125
3.2	Coloração imunocitoquímica de pan-leucócitos (CD45)	126
3.2.1	Princípio	126
3.2.2	Reagentes	126
3.2.3	Procedimento	127
3.3	Interação entre espermatozoides e muco cervical	130
3.3.1	Teste in vivo (pós-coital)	130
3.3.2	Testes in vitro	133
3.3.3	Teste de lâmina simplificado in vitro	134
3.3.4	Teste de tubo capilar	135
3.4	Ensaio bioquímicos para a função dos órgãos sexuais acessórios	138
3.4.1	Medição de zinco no plasma seminal	139
3.4.2	Medição de frutose no plasma seminal	140
3.4.3	Medição de α -glucosidase neutra no plasma seminal	142
3.5	Análise de esperma assistida por computador (CASA)	145
3.5.1	Introdução	145
3.5.2	Uso de CASA para avaliar a motilidade dos espermatozoides	146
3.5.3	Uso de CASA para estimar a concentração de espermatozoides	149
3.5.4	Avaliação morfométrica espermática auxiliada por computador	149
Capítulo 4	Procedimentos de pesquisa	151
4.1	Espécies que reagem ao oxigênio	151
4.1.1	Introdução	151
4.1.2	Medição de espécies reativas de oxigênio geradas por suspensões de espermatozoides	152
4.2	Testes de interação espermatozoide-oócito humano	156
4.3	Testes de ligação da zona pelúcida humana	156
4.4	Avaliação da reação acrossômica	156
4.4.1	Procedimento para a avaliação da fluorescência do estado acrossomal	157
4.4.2	Ensaio de reação acrossômica induzida	159
4.5	Teste de penetração de oócitos de hamster sem zona	161
4.5.1	Protocolo	162
4.6	Avaliação da cromatina espermática	167

PARTE II.

PREPARAÇÃO DO ESPERMA

Capítulo 5	Técnicas de preparação de esperma	169
5.1	Introdução	169
5.1.1	Separação dos espermatozoides do plasma seminal	169
5.1.2	Escolha do método	169
5.1.3	Eficiência da separação de espermatozoides do plasma seminal e organismos contagiosos	170
5.2	Princípios gerais	170
5.3	Lavagem simples	171
5.3.1	Reagentes	171
5.3.2	Procedimento	171
5.4	“Swim-up” (Capacitação Espermática) direto	172
5.4.1	Reagentes	172
5.4.2	Procedimento	172

5.5	Gradientes de densidade descontínua	173
5.5.1	Reagentes	173
5.5.2	Procedimento	174
5.6	Preparando amostras de sêmen infectadas com HIV	174
5.7	Preparando espermatozoides testiculares e epididimários	175
5.7.1	Método enzimático	175
5.7.2	Método mecânico	175
5.7.3	Processando suspensões espermáticas para injeção intracitoplasmática de espermatozoides	176
5.8	Preparando amostras de ejaculação retrógrada	176
5.9	Preparando amostras de ejaculação assistida	177
Capítulo 6	Criopreservação de espermatozoides	178
6.1	Introdução	178
6.2	Protocolos de criopreservação de sêmen	182
6.2.1	Procedimento padrão	182
6.2.2	Protocolos de congelamento modificados para amostras oligozoospermáticas e espermatozoides recuperados cirurgicamente	185
6.2.3	Rotulagem de lâminas e frascos	186

PARTE III.

GARANTIA DA QUALIDADE

Capítulo 7	Garantia de qualidade e controle de qualidade	188
7.1	Controle de qualidade no laboratório de andrologia	188
7.2	A natureza dos erros na análise do sêmen	188
7.3	Minimizando o erro de amostragem estatístico	189
7.4	O programa de garantia de qualidade	191
7.5	Manual de procedimentos laboratoriais	192
7.6	Controle de qualidade interno	192
7.6.1	Amostras comerciais de Controle de Qualidade Interno	193
7.6.2	Amostras de Controle de Qualidade Interno produzidas no laboratório	193
7.6.3	Amostras de Controle Interno armazenadas (comerciais ou produzidas no laboratório)	193
7.6.4	Amostras de Controle de Qualidade Interno frescas (produzidas em laboratório)	194
7.7	Procedimentos estatísticos para analisar e informar erros sistemáticos entre técnicos	195
7.7.1	O gráfico \bar{X}	195
7.7.2	O gráfico S	197
7.8	QC para percentagens	199
7.9	Avaliando os gráficos \bar{X} e S	199
7.9.1	Como reconhecer valores fora de controle	200
7.9.2	Causas de valores fora de controle	200
7.9.3	Respostas a valores fora de controle	201
7.10	Procedimentos estatísticos para analisar e informar a variabilidade do técnico	201
7.10.1	Comparando os resultados de dois ou mais técnicos	201
7.10.2	Monitorando médias mensais	203
7.11	Controle de qualidade externo e garantia de qualidade	204
7.11.1	Avaliação dos resultados do Controle de Qualidade Externo	206
7.11.2	Respostas a resultados fora de controle	207
7.12	Frequência e prioridade do controle de qualidade	207
7.13	Treinamento	208

7.13.1	Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a concentração de espermatozoides	208
7.13.2	Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a morfologia dos espermatozoides	211
7.13.3	Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a motilidade dos espermatozoides	212
7.13.4	Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a vitalidade dos espermatozoides	213

REFERÊNCIAS

APÊNDICES

Apêndice 1	Valores de referência e nomenclatura do sêmen	231
A1.1	Valores de referência	231
A1.2	Nomenclatura	233
Apêndice 2	Equipamento e segurança	235
A2.1	Suprimentos básicos necessários em um laboratório de andrologia	235
A2.2	Potenciais riscos biológicos em um laboratório de andrologia	237
A2.3	Procedimentos de segurança para pessoal de laboratório	237
A2.4	Procedimentos de segurança para equipamentos de laboratório	240
A2.5	Precauções de segurança ao manusear nitrogênio líquido	240
Apêndice 3	Microscopia	242
A3.1	Montando a amostra	242
A3.2	Ajustando as oculares	244
A3.3	Focando a imagem	244
A3.4	Focando as oculares	244
A3.5	Focando o condensador de luz	244
A3.6	Centrando o condensador	245
A3.7	Ajustando os anéis de fase	245
A3.8	Microscopia de fluorescência	245
Apêndice 4	Soluções padrão	246
A4.1	Biggers, Whitten e Whittingham	246
A4.2	Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco	246
A4.3	Meio de Earle	247
A4.4	Meio F-10 de Ham	247
A4.5	Solução salina equilibrada de Hanks	247
A4.6	Fluido tubário humano	247
A4.7	Meio de Krebs-Ringer	248
A4.8	Solução salina Tris-tamponada	248
A4.9	Solução de Tyrode	249
A4.10	Coloração de Papanicolaou	249
Apêndice 5	Muco cervical	252
A5.1	Introdução	252
A5.2	Coleta e preservação do muco cervical	253
A5.3	Avaliação do muco cervical	254

Apêndice 6 Formulários de registro para análises de sêmen e muco cervical 258

A6.1	Modelo para um formulário de registro de análise de sêmen	258
A6.2	Modelo para um formulário de registro de muco cervical	260

Apêndice 7 Erros de amostragem e controle de qualidade 261

A7.1	Erros na medição da concentração de espermatozoides	261
A7.2	A importância de entender erros de amostragem	263
A7.3	Erros na medição de porcentagens	264
A7.4	Produção de amostras de sêmen para controle de qualidade	268
A7.5	Preparação de uma gravação de vídeo para controle de qualidade interno de análise de motilidade espermática	268
A7.6	Preparação de sêmen diluído para controle interno da qualidade na determinação da concentração espermática	272
A7.7	Preparação de lâminas para controle de qualidade interno de avaliação da morfologia espermática	276
A7.8	Calibração de equipamentos	278

Apêndice 8 Programas nacionais de controle de qualidade externa para análise de sêmen 280

FIGURAS

Fig 2.1	Variação do número total de espermatozoides e concentração espermática durante um período de um ano e meio	7
Fig 2.2	Agregação não específica de espermatozoides no sêmen	16
Fig 2.3	Diagrama esquemático de diferentes extensões de aglutinação de espermatozoides	18
Fig 2.4	Dicas para avaliar a motilidade dos espermatozoides	21
Fig 2.5	Esfregaço de eosina-nigrosina observado em óptica de campo claro	25
Fig 2.6	Representação esquemática de alterações morfológicas típicas em espermatozoides humanos submetidos a estresse hipoosmótico	29
Fig 2.7	O hemocítmetro de Neubauer melhorado	31
Fig 2.8	Quais espermatozoides contar nos quadrados da grade	32
Fig 2.9	Exame de toda a lamínula para procura de espermatozoides móveis	42
Fig 2.10	Espermatozoides morfolologicamente "normais"	53
Fig 2.11	Métodos de esfregaço de sêmen para morfologia espermática	54
Fig 2.12	Preparando um esfregaço de sêmen normal	55
Fig 2.13	Desenhos esquemáticos de algumas formas anormais de espermatozoides humanos	64
Fig 2.14	Células positivas e negativas para peroxidase no sêmen humano	102
Fig 3.1	Leucócitos no sêmen	118
Fig 3.2	O medidor de penetração de espermatozoides de Kremer	125
Fig 3.3	Terminologia padrão para variáveis medidas pelos sistemas CASA	136
Fig 4.1	Quimioluminescência gerada em resposta ao tratamento com zimosano opsonizado	143
Fig 4.2	Contribuições relativas feitas por subpopulações de leucócitos e espermatozoides para a capacidade de geração de oxigênio reativo da suspensão celular	144
Fig 4.3	Coloração de espermatozoides humanos com aglutinina <i>Pisum sativum</i> fluorescente (PSA)	148
Fig 4.4	Micrografia de contraste de fase de um oócito de hamster sem zona contendo espermatozoides humanos	155

Fig 7.1	Um gráfico \bar{X} para concentração de espermatozoides	185
Fig 7.2	Um gráfico S para concentração de espermatozoides	186
Fig 7.3	Um gráfico Bland–Altman de estimativas manuais e do sistema CASA da porcentagem de motilidade espermática progressiva	190
Fig 7.4	Gráfico de estimativas de Youden da concentração de espermatozoides	190
Fig A2.1	Nomograma para determinar a força centrífuga relativa (RCF) a partir do raio do rotor e a velocidade de rotação	225
Fig A5.1	Exemplos de formação de “figuras de samambaia” no muco cervical seco ao ar em uma lâmina de vidro	240
Fig A7.1	Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas em função do número total de espermatozoides avaliados	249
Fig A7.2	As diferenças aceitáveis entre duas avaliações de porcentagem replicadas em função da porcentagem real e do número total de espermatozoides avaliados	253
Fig A7.3	Dicas para avaliar a motilidade dos espermatozoides	258
Fig A7.4	Visualização através de uma ocular com retículo (grade vermelha)	258
Fig A7.5	Visualização da imagem gravada em vídeo do micrômetro da platina no monitor e no acetato desenhado; veja o texto para explicação	259

QUADROS

Quadro 2.1	Conformidade da compatibilidade dos recipientes de coleta de sêmen	9
Quadro 2.2	Preparação de bromelaína	12
Quadro 2.3	Mistura completa de sêmen	15
Quadro 2.4	Profundidade das preparações úmidas	16
Quadro 2.5	Erros na estimativa de porcentagens	21
Quadro 2.6	Comparação de porcentagens replicadas	22
Quadro 2.7	Erros na estimativa de números	33
Quadro 2.8	Atingir 200 espermatozoides por réplica nas três grades centrais da câmara melhorada de Neubauer	34
Quadro 2.9	Volume observado por campo de alta potência de uma preparação úmida com 20 μm de profundidade	35
Quadro 2.10	Comparação de contagens replicadas	38
Quadro 2.11	Atingir 200 espermatozoides por réplica em todas as nove grades centrais da câmara melhorada de Neubauer	44
Quadro 2.12	Atingir 200 espermatozoides por réplica em uma câmara descartável de grande volume com 100 μm de profundidade	47
Quadro 2.13	Volume observado por campo de alta potência em uma câmara descartável de grande volume com 100 μm de profundidade	49
Quadro 2.14	Meios de montagem	58
Quadro 3.1	Preparação da mistura de cera com vaselina	121
Quadro 3.2	Volume observado por campo de alta potência em uma preparação de muco com 100 μm de profundidade	121
Quadro 4.1	Indução da ovulação em hamsters	153
Quadro 4.2	Preparação de pipetas de vidro	154
Quadro 6.1	Razões para a criopreservação de espermatozoides	168
Quadro 6.2	Avaliação de risco da criopreservação e o armazenamento de sêmen humano	169
Quadro 7.1	Terminologia em garantia de qualidade e controle de qualidade	178
Quadro 7.2	Determinando os valores para os limites de aviso e controle de ação de um gráfico \bar{X}	184
Quadro 7.3	Método alternativo para calcular os limites de controle \bar{X} a partir do	184

	desvio padrão combinado	
Quadro 7.4	Determinando os valores para os limites de aviso e controle de ação de um gráfico S	186
Quadro 7.5	Regras de controle básicas para gráficos de controle de qualidade	188
Quadro 7.6	Avaliando diferenças sistemáticas entre técnicos	193
Quadro 7.7	Principais características dos procedimentos em Controle de Qualidade Interno	194
Quadro 7.8	Cronograma para controle de qualidade	195
Quadro 7.9	Resumo dos testes de Controle de Qualidade	196
Quadro A2.1	Calculando forças centrífugas	224
Quadro A3.1	Lente objetiva	230
Quadro A5.1	Determinando o volume de muco coletado	241
Quadro A5.2	Volume observado por campo de alta potência em uma preparação de muco com 100 μ m de profundidade	243

TABELAS

Tabela 2.1	Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 200 espermatozoides (total de 400 contados)	22
Tabela 2.2	Erros de amostragem arredondados (%) de acordo com o número total de espermatozoides	33
Tabela 2.3	Diluições de sêmen necessárias, como fazê-las, quais câmaras usar e áreas potenciais para avaliar	35
Tabela 2.4	Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas para uma determinada soma	38
Tabela 2.5	Diferenças aceitáveis entre duas contagens para uma soma dada: baixas concentrações	45
Tabela 2.6	Explicações usadas nos comentários das Placas (1–14)	67
Tabela 2.7	Quantidade de sêmen a ser utilizado para um teste com imunoesferas	109
Tabela 3.1	Cálculo de índices de múltiplos defeitos espermáticos	114
Tabela 3.2	Índice de defeitos espermáticos para homens de casais férteis e inférteis	115
Tabela 3.3	Ordem de classificação da densidade de penetração de espermatozoides	126
Tabela 3.4	Classificação dos resultados dos testes de tubos capilares	127
Tabela 7.1	Fatores para determinar os limites de controle para gráficos \bar{X} e gráficos S baseados no desvio padrão médio ($S_{\bar{X}}$)	183
Tabela 7.2	Fontes de variação (erro) na avaliação da concentração espermática e soluções propostas	197
Tabela 7.3	Fontes de variação (erro) na avaliação da morfologia dos espermatozoides e soluções propostas	198
Tabela 7.4	Fontes de variação (erro) na avaliação da motilidade dos espermatozoides e soluções propostas	199
Tabela 7.5	Fontes de variação (erro) na avaliação da vitalidade dos espermatozoides e soluções propostas	200
Tabela A1.1	Limites de referência mais baixos (5º percentis e seus intervalos de confiança de 95%) para as características do sêmen	219
Tabela A1.2	Distribuição de valores dos parâmetros do sêmen de homens cujas parceiras engravidaram no prazo de 12 meses após a interrupção do uso de contraceptivos	219
Tabela A1.3	Nomenclatura relacionada à qualidade do sêmen	221

Tabela A7.1	Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas para uma determinada soma	249
Tabela A7.2	Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 100 espermatozoides (total de 200 contados)	254
Tabela A7.3	Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 200 espermatozoides (total de 400 contados)	254
Tabela A7.4	Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 400 espermatozoides (total de 800 contados)	254

Agradecimentos

Esta publicação foi produzida pelo Programa Especial do PNUD / UNFPA / OMS / o Programa Especial para a Pesquisa do Banco Mundial, Desenvolvimento e Treinamento em Pesquisa da Reprodução Humana (HRP), Departamento de Saúde Reprodutiva e Pesquisa da OMS (RHR). A participação dos seguintes indivíduos na preparação e edição deste manual é reconhecida com gratidão:

Editor chefe

Dr Trevor G Cooper

Centro de Medicina Reprodutiva e Andrologia da Universidade, Münster, Alemanha
(Centro Colaborador da OMS para Pesquisa em Reprodução Masculina)

Equipe Editorial

Dr John Aitken

Faculdade de Ciências Biológicas da Vida e Ciências Ambientais, University Drive Callaghan, New South Wales, Austrália

Dr Jacques Auger

Serviço de Biologia da Reprodução
Pavillon Cassini Hôpital Cochin
Paris, França

Dr HW Gordon Baker

Universidade de Melbourne,
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Royal Women's Hospital
Carlton, Victoria, Austrália

Dr Chris LR Barratt

Divisão de Ciências da Saúde Materna e Infantil
Faculdade de Medicina
Ninewells Hospital
Dundee, Escócia

Dr Hermann M Behre

Centro de Medicina Reprodutiva e Andrologia

Universidade Martin Luther de Halle-Wittenberg
Halle, Alemanha

Dr Lars Björndahl

Centro de Andrologia,
Universidade Karolinska, Hospital e Instituto,
Estocolmo, Suécia

Charlene Brazil

Centro de Saúde e Meio Ambiente
Universidade da Califórnia
Davis, CA, EUA

Dr Christopher De Jonge

Universidade de Minnesota
Centro de Medicina Reprodutiva
Minneapolis, MN, EUA

Dr Gustavo F Doncel

CONRAD
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia de Virgínia Oriental
Escola de Medicina
Norfolk, VA, EUA

Dr Daniel Franken

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Hospital Tygerberg
Tygerberg, África do Sul

Dr Trine B Haugen

Faculdade de Ciências da Saúde
Escola Superior de Oslo
Oslo, Noruega

Dr Aucky Hinting

Unidade de Andrologia,
Departamento de Biomedicina
Faculdade de Medicina
Universidade de Airlangga,
Surabaya, Indonésia

Godwin E Imade

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Jos
Jos, Nigéria

Dr Thinus F Kruger

Unidade de Biologia Reprodutiva
Universidade de Stellenbosch

Tygerberg, África do Sul
Dr Hesbon O Odongo
 Departamento de Zoologia
 Universidade de Nairobi
 Nairobi, Quênia

Elizabeth Noonan
 Centro de Pesquisa em Câncer Fred
 Hutchinson
 Centro Estatístico para Pesquisa e
 Prevenção do HIV/AIDS
 Seattle, WA, EUA

Dr Steven M Schrader
 Instituto Nacional de Segurança e Saúde
 Ocupacional
 Centros de Controle e Prevenção de
 Doenças
 Cincinnati, OH, EUA

Dr Christina CL Wang
 Centro Médico Harbor-UCLA
 Torrance, CA, EUA

Dr William Shu-Biu Yeung
 Departamento de Obstetrícia e
 Ginecologia
 Universidade de Hong Kong
 Hong Kong SAR, China

**Secretaria da OMS,
 Departamento de Saúde Reprodutiva e
 Pesquisa**

Dr Kirsten M Vogelsong
 Cientista
 Gerente de Área de Pesquisa

Dr Sigrid von Eckardstein
 Ex-Gerente de Área de Pesquisa em
 Ação

Dr Michael T Mbizvo
 Diretor *ad interim*

Maud Keizer
 Secretária

Agradecimentos adicionais para: Cathy Treece, Charlene Tollner e o professor Jim Overstreet (Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA) pela produção de micrografias morfológicas e verificação da mídia; Dr. Rune Eliasson (Hospital Sophia hemmet, Estocolmo, Suécia) por ajudar na definição de células não-espermáticas; Dr. Timothy Farley (Organização Mundial da Saúde, Genebra, Suíça) pela revisão das seções sobre controle de qualidade; e o Dr. Gary N Clarke (Royal Women's Hospital, Carlton, Austrália), o Dr. Roelof Menkveld (Hospital Acadêmico Tygerberg e Universidade de Stellenbosch, Tygerberg, África do Sul) e o Professor Pieter Wranz (Universidade de Stellenbosch, Tygerberg, África do Sul) por fornecer informações adicionais usadas na compilação do manual.

O apoio financeiro da Sociedade Internacional de Andrologia é reconhecido com gratidão.

Esta edição do manual é dedicada à memória do falecido Geoffrey Waites (1928–2005), ex-gerente da Força Tarefa da OMS sobre Métodos para a Regulamentação da Fertilidade Masculina e coeditor da segunda, terceira e quarta edições deste manual de laboratório. A devoção do comitê editorial à sua tarefa foi impulsionada pela sua apreciação da honestidade, justiça e preocupação de Geoff pelos desprivilegiados.

O PNCQ agradece aos seguintes profissionais de Análises Clínicas que ajudaram a revisar o documento traduzido:

1. Dr. Orildo dos Santos Pereira
2. Dr. Francisco Edison Pacifici Guimarães
3. Dr. José Abol Corrêa

Siglas e abreviaturas usadas neste manual

Ac	Anticorpo
AI	Inseminação artificial
AID	Inseminação artificial com sêmen de doador
AIH	Inseminação artificial com sêmen do marido
ALH	Amplitude de deslocamento da cabeça lateral
ANOVA	Análise de variância
APAAP	Complexo de fosfatase alcalina-fosfatase antialcalina
AR	Acrossoma reagido
ART	Tecnologia reprodutiva assistida
ASA	Anticorpo antiesperma
BAEE	Éster etílico da N-benzoil-L-arginina
BCF	Frequência de batimento de cauda (Hz)
BSA	Albumina de soro bovino
BWW	Biggers, Whitten e Whittingham
CASA	Análise de esperma assistida por computador
CASMA	Avaliação morfométrica espermática auxiliada por computador
CBAVD	Ausência bilateral congênita do ducto deferente
CD	Disco compacto
CD	Gota citoplasmática
CD45	Cluster de determinação 45 (marcador pan-leucócito)
CD46	Cluster de determinação 46 (antígeno acrossomal)
IC	Intervalo de confiança
LC	Limites de confiança
CO	Dióxido de carbono
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
DVD	Disco versátil digital
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EQA	Garantia de qualidade externa
EQC	Controle de qualidade externo
ERC	Citoplasma residual em excesso
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
GIFT	Transferência intrafalopiana de gametas
GPC	Glicerofosfolina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina equilibrada de Hanks
HBV	Vírus da hepatite B
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOP	Penetração de oócitos de hamster
HOS	Inchaço hipoosmótico
HPF	Campo de alta potência
HRP	Peroxidase de rábano
HSA	Albumina de soro humano
HTF	Fluido tubário humano
IB	Immunobead
IBT	Teste immunobead
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
Ig	Imunoglobulina
IM	Imobilidade

IQC	Controle de qualidade interno
IU	Unidade internacional
IUI	Inseminação intrauterina
IVF	Fertilização in vitro
KRM	Meio de Krebs-Ringer
LIN	Índice de progressão
LLQ	Limite inferior de quantificação
LPF	Campo de baixa potência
MAD	Deslocamento angular médio
MAI	Índice de anomalias múltiplas
MAR	Reação mista de antiglobulina
NA	Abertura numérica
NP	Não progressiva (motilidade)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDCA	Planejar, fazer, checar, atuar
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSG	Gonadotropina sérica de égua grávida
PNPG	Glucopiranosídeo de <i>p</i> -nitrofenol
PR	Progressiva (motilidade)
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
QA	Garantia da qualidade
QC	Controle de qualidade
RCF	Força centrífuga relativa
RI	Índice de refração
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies que reagem ao oxigênio
r.p.m.	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
SDI	Índice de deformidade espermática
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Erro padrão
SOP	Procedimento operacional padrão
STR	Linearidade (VSL/VAP)
TBS	Solução salina Tris-tamponada
TGG	Glicose glicerol de Tyrode
TZI	Índice de teratozoospermia
VAP	Velocidade média na trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva (retilínea)
OMS	Organização Mundial da Saúde
WOB	Oscilação (VAP/VCL)

CAPÍTULO 1 Antecedentes

1.1 Introdução

O *manual de laboratório da OMS para o exame da interação sêmen humano e muco-cervical* foi publicado pela primeira vez em 1980, em resposta a uma crescente necessidade de padronização de procedimentos para o exame do sêmen humano. Desde então, foi atualizado três vezes e traduzido em várias línguas. Nos últimos 30 anos, o manual foi reconhecido por fornecer padrões globais e tem sido amplamente utilizado por laboratórios de pesquisa e de clínicas no mundo todo.

Apesar desse sucesso, tornou-se evidente que algumas recomendações de edições anteriores do manual precisavam ser revisadas à luz de novas evidências e que alguns conceitos precisavam de mais explicações e evidências de apoio. Solicitada por estas considerações, a OMS estabeleceu um comitê editorial para revisar todos os métodos descritos no manual, com o objetivo de endossá-los, modificá-los ou atualizá-los. Em muitos casos, isso se mostrou difícil, pois dados insuficientes haviam sido obtidos usando os métodos descritos no manual. Em alguns casos, laboratórios individuais e bem credenciados obtinham resultados consistentes, mas estes não haviam sido confirmados por outros. Para essas situações, o comitê editorial desenvolveu uma posição de consenso após avaliar a literatura pertinente.

Recomendações adicionais foram recebidas de técnicos e cientistas em quanto à necessidade de mais detalhes para muitos dos métodos descritos. A falta de detalhes nas edições anteriores levou a que alguns laboratórios preferiram usar métodos descritos em outros lugares, ou desenvolveram suas próprias versões de métodos, enquanto ainda afirmam realizar análises de sêmen de acordo com o manual da OMS. A fim de facilitar comparações globais, esta edição do manual, portanto, inclui muito mais detalhes e a justificativa é explicada quando métodos alternativos de análise são apresentados. Recomenda-se que, ao relatar resultados em artigos publicados, os laboratórios indiquem qual método específico foi usado quando se referirem a este manual.

1.2 A quinta edição

A quinta edição compreende três partes: análise de sêmen (Capítulos 2–4), preparação do esperma (Capítulos 5 e 6) e garantia de qualidade (Capítulo 7). A parte I, que trata da análise do sêmen, assemelha-se à das edições anteriores, mas é dividida em três capítulos: métodos padrão, que são procedimentos rotineiros robustos para determinar a qualidade do sêmen; testes opcionais, que podem ser utilizados em determinadas situações ou por escolha do laboratório; e testes de pesquisa, que atualmente não são considerados rotineiros. Como a cultura do sêmen não é normalmente realizada em um laboratório de andrologia, isso é mencionado apenas na seção sobre coleta estéril de sêmen. A seção sobre a preparação dos esperma estende-se além do ejaculado para incluir os espermatozoides obtidos dos testículos e epidídimos. Intercaladas com instruções metodológicas com marcadores estão as Notas (explicações da metodologia), Comentários (interpretação dos resultados) e Caixas (contendo material explicativo adicional).

As principais características desta quinta edição estão descritas abaixo.

- Os capítulos sobre análise de sêmen incluem detalhes de todas as soluções de trabalho, procedimentos, cálculos e interpretação, de modo que qualquer metodologia dada está essencialmente completa com mínima referência cruzada para outras partes do manual.
- A seção sobre a preparação de espermatozoides foi ampliada e um capítulo sobre criopreservação de espermatozoides foi adicionado. Procedimentos relacionados à análise do muco cervical foram divididos entre o capítulo sobre procedimentos opcionais e um apêndice sobre características do muco.
- Há menos apêndices do que nas edições anteriores e estão restritos a informações especializadas ou raramente necessárias.
- *Avaliação do número de espermatozoides.* As diluições de sêmen e as áreas da câmara de contagem usadas para avaliar o número de espermatozoides em uma amostra de sêmen foram alteradas para permitir a contagem de 200 espermatozoides por alíquota utilizada. A importância dos erros de amostragem e a certeza dos resultados numéricos obtidos são enfatizadas. O comitê editorial considerou que o número total de espermatozoides por ejaculado fornece uma avaliação mais precisa da função testicular do que a concentração de espermatozoides, mas para isso o volume de sêmen tem que ser medido com precisão.
- *Avaliação de azoospermia.* Embora superficialmente simples, o diagnóstico de azoospermia é confundido por muitos fatores, incluindo grandes erros associados com a contagem de poucos espermatozoides, o grande número de campos microscópicos a serem analisados e as dificuldades em examinar aglomerações de esperma carregadas de detritos. As mudanças recomendadas incluem o exame de amostras fixadas, amostras não-centrifugadas e a sensibilidade dos métodos de contagem empregados. No entanto, também estão incluídos os métodos de centrifugação necessários para acumular um número suficiente de células para procedimentos terapêuticos e os métodos para a detecção de espermatozoides móveis em amostras não-fixadas para avaliação de sêmen pós-vasectomia.
- *Avaliação de motilidade.* Uma grande mudança respeito às edições anteriores está na categorização da motilidade dos espermatozoides. Recomenda-se agora que os espermatozoides sejam categorizados como progressivamente móveis não progressivamente móveis e imóveis (em vez das notas a, b, c ou d).
- *Avaliação da morfologia dos espermatozoides.* Alguns laboratórios avaliam apenas formas normais, enquanto outros consideram o tipo, localização e extensão da anormalidade como mais importantes. Se essas avaliações, ou diferenciais, ou semiquantitativas, aumentam o valor da análise do sêmen, permanece controverso. Evidências que apoiam a relação entre a porcentagem de formas normais (como definido pela categorização estrita ou avaliação auxiliada por computador da morfologia) e taxas de fertilização *in vivo* justificam a tentativa de determinar uma subpopulação morfolologicamente distinta de espermatozoides dentro do sêmen. Nesta edição são incluídas mais

micrografias, e de melhor qualidade, de espermatozoides considerados normais e limítrofes, acompanhadas de explicações de por que cada espermatozoide foi classificado dessa maneira. Isso deve ajudar na formação de técnicos especializados em categorizar os espermatozoides de forma fidedigna. Dados recentes de uma população fértil forneceram dados de valores de referência para a porcentagem de formas morfolologicamente normais.

- *Controle de qualidade.* Este capítulo foi completamente reescrito. É necessária uma garantia de qualidade rigorosa para a análise do sêmen para que os métodos analíticos sejam robustos. Dicas e sugestões são dadas sobre como melhorar o desempenho do laboratório quando os resultados do controle de qualidade são insatisfatórios.
- *Intervalos de referência e limites de referência.* Os dados que caracterizam a qualidade do sêmen em homens férteis, cujas parceiras tiveram um tempo de gravidez de 12 meses ou menos, forneceram as faixas de referência para este manual. Dados brutos entre 400 e 1900 amostras de sêmen, de pais recentes em oito países de três continentes, foram usados para gerar os intervalos de referência. A tradição estatística convencional consiste em considerar o percentil 2.5 de um intervalo de referência bilateral como o limiar abaixo do qual os valores podem ser considerados provenientes de uma população diferente. No entanto, um intervalo de referência unilateral foi considerado mais apropriado para o sêmen, uma vez que valores altos de qualquer parâmetro não são prejudiciais à fertilidade. O 5º percentil é dado como o limite de referência inferior e a distribuição completa para cada parâmetro de sêmen também é dada no Apêndice 1.

1.3 Alcance do manual

Os métodos descritos aqui servem como diretrizes para melhorar a qualidade da análise do sêmen e a comparabilidade dos resultados. Eles não devem necessariamente ser tomados como obrigatórios pelos organismos locais, nacionais ou globais de acreditação de laboratórios. A análise de sêmen pode ser útil em ambientes clínicos e de pesquisa, para investigar o estado de fertilidade masculina, bem como monitorar a espermatogênese durante e após a regulação da fertilidade masculina.

PARTE I.

Análise do sêmen

CAPÍTULO 2 Procedimentos padrão

2.1 Introdução

Durante a ejaculação, o sêmen é produzido a partir de uma suspensão concentrada de espermatozoides, armazenados nos dois epidídimos, misturados com, e diluídos por secreções líquidas dos órgãos sexuais acessórios. É emitido em vários bolos. A comparação dos volumes de sêmen pré e pós-vasectomia revela que cerca de 90% do volume de sêmen é constituído por secreções dos órgãos acessórios (Weiske, 1994), principalmente a próstata e as vesículas seminais, com contribuições menores das glândulas bulbouretrais (Cowper) e dos epidídimos.

O sêmen tem dois principais atributos quantificáveis:

- O número total de espermatozoides: isso reflete a produção de espermatozoides pelos testículos e a patência do sistema de ductos pós-testiculares;
- O volume total de fluidos fornecidos pelas várias glândulas acessórias: isso reflete a atividade secretora das glândulas.

A natureza dos espermatozoides (sua vitalidade, motilidade e morfologia) e a composição do fluido seminal também são importantes para a função espermática.

Durante a relação sexual, a fração prostática inicial e rica em espermatozoides do sêmen ejaculado pode entrar em contato com o muco cervical que se estende para a vagina (Sobrero & MacLeod, 1962), com o restante do fluido permanecendo como um reservatório na vagina. Em contraste, no ambiente de laboratório, todo o ejaculado é coletado em um recipiente, onde os espermatozoides ficam presos em um coágulo desenvolvido a partir de proteínas de origem vesicular seminal. Esse coágulo é subsequentemente liquefeito pela ação de proteases prostáticas, durante as quais sua osmolalidade aumenta (Björndahl & Kvist, 2003; Cooper et al., 2005).

Há alguma evidência de que a qualidade das amostras de sêmen varia dependendo de como o ejaculado é produzido. Os ejaculados produzidos pela masturbação e coletados em recipientes em uma sala próxima ao laboratório podem ser de qualidade inferior àqueles recuperados de preservativos não espermicidas usados durante a relação sexual em casa (Zavos & Goodpasture, 1989). Essa diferença pode refletir uma forma diferente de excitação sexual, já que o tempo gasto produzindo uma amostra pela masturbação - refletindo a extensão da emissão seminal antes da ejaculação - também influencia a qualidade do sêmen (Pound et al., 2002).

Em determinadas condições de coleta, a qualidade do sêmen depende de fatores que normalmente não podem ser modificados, como a produção de espermatozoides pelos testículos, secreções de órgãos acessórios e doenças recentes (particularmente febris), além de outros fatores, como o tempo de abstenção, que devem ser registrados e levados em conta na interpretação dos resultados.

Os resultados das medições laboratoriais da qualidade do sêmen dependerão de:

- Se uma amostra completa é coletada. Durante a ejaculação, as primeiras frações de sêmen descartadas são principalmente fluidos prostáticos ricos em espermatozoides enquanto as frações posteriores são dominadas pelo fluido vesicular seminal (Björndahl & Kvist, 2003). Portanto, perder a primeira porção (rica em espermatozoides) do ejaculado tem mais influência sobre os resultados da análise do sêmen do que perder a última porção.
- A atividade das glândulas sexuais acessórias, cujos fluidos diluem os espermatozoides epididimários concentrados na ejaculação (Eliasson, 2003). A concentração de espermatozoides não é uma medida direta da produção espermática dos testículos, pois é influenciada pelo funcionamento de outros órgãos reprodutivos; no entanto, o número total de espermatozoides ejaculados é (concentração de espermatozoides multiplicada pelo volume de sêmen). Por exemplo, as concentrações espermáticas no sêmen de homens jovens e idosos podem ser as mesmas, mas o número total de espermatozoides pode diferir, já que tanto o volume de fluido seminal quanto o total de espermatozoides diminuem com a idade, pelo menos em algumas populações (Ng et al., 2004).
- O tempo desde a última atividade sexual. Na ausência de ejaculação, os espermatozoides se acumulam nos epidídimos, depois transbordam para a uretra e são liberados na urina (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004). A vitalidade espermática e a cromatina não são afetadas pelo aumento do tempo de abstinência (Tyler et al., 1982b; De Jonge et al., 2004), a menos que a função epididimária seja perturbada (Correa-Perez et al., 2004).
- O penúltimo período de abstinência. Como os epidídimos não são completamente esvaziados por uma ejaculação (Cooper et al., 1993), alguns espermatozoides permanecem do tempo da ejaculação anterior. Isso influencia a faixa etária e a qualidade dos espermatozoides no ejaculado (Tyler et al., 1982a). A extensão dessa influência é difícil de determinar e raramente é levada em conta.
- O tamanho do testículo, que influencia o número total de espermatozoides por ejaculado (Handelsman et al., 1984; OMS, 1987; Behre et al., 2000; Andersen et al., 2000). O tamanho testicular reflete o nível de atividade espermatogênica, que também afeta a morfologia espermática (Holstein et al., 2003).

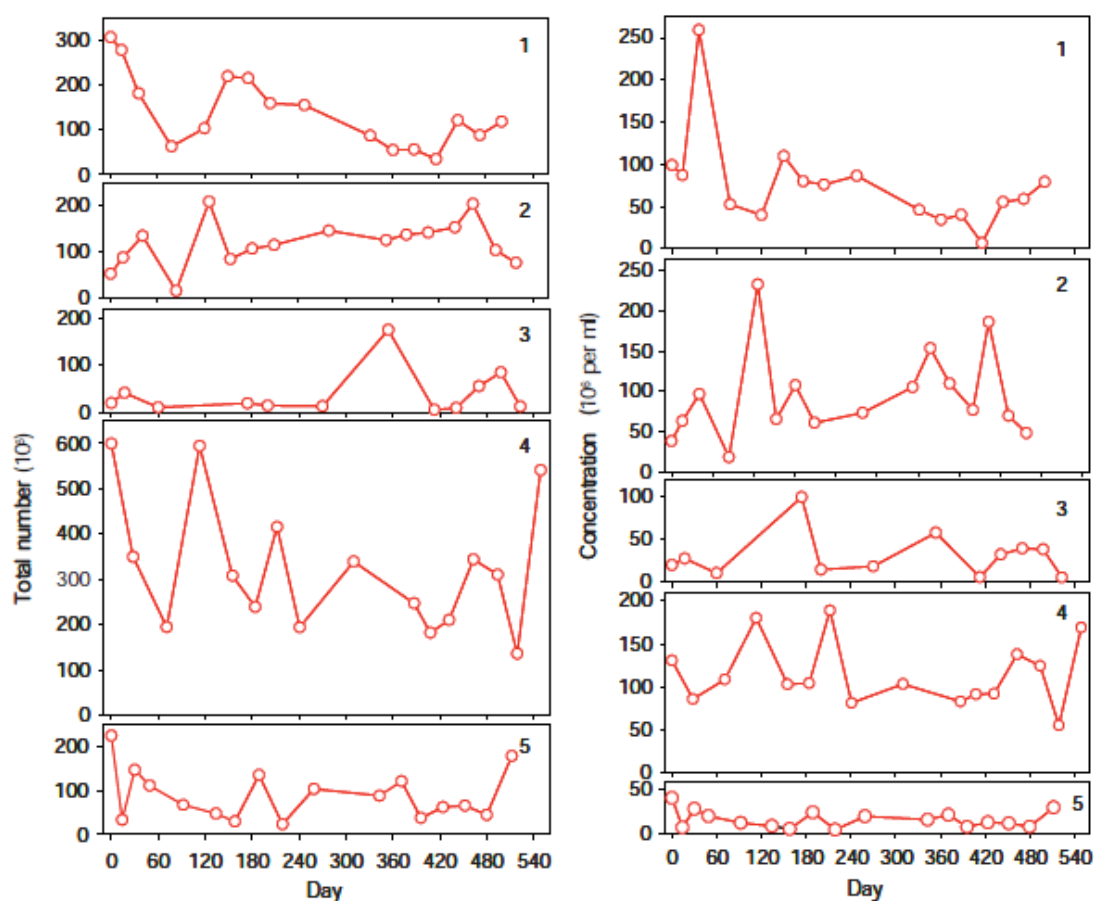
Comentário: A grande variação biológica na qualidade do sêmen (Castilla et al., 2006) reflete os muitos fatores listados acima e requer que todas as medidas no sêmen sejam precisas.

Esses fatores variáveis e amplamente incontroláveis explicam a conhecida variação intraindividual da composição do sêmen (Baker & Kovacs, 1985; Alvarez et al., 2003). A Fig. 2.1 mostra as variações ao longo do tempo na composição do sêmen, avaliadas pelos métodos recomendados pela OMS, de cinco jovens voluntários saudáveis que participaram no grupo placebo de um estudo de contracepção hormonal masculina. Tal variabilidade tem consequências para a interpretação das análises do sêmen:

- É impossível caracterizar a qualidade do sêmen de um homem a partir da avaliação de uma única amostra de sêmen.
- É útil examinar duas ou três amostras para obter dados de linha de base (Poland et al., 1985; Berman et al., 1996; Carlsen et al., 2004; Castilla et al., 2006; Keel, 2006).

Enquanto as medições feitas em toda a população de espermatozoides ejaculados não podem definir a capacidade de fertilização dos poucos que chegam ao local de fertilização, a análise do sêmen, no entanto, fornece informações essenciais sobre o estado clínico de um indivíduo. Todos os aspectos da coleta e análise de sêmen devem ser feitos através de procedimentos adequadamente padronizados, para que os resultados forneçam informações úteis e válidas. Os testes descritos neste capítulo são procedimentos aceitos que constituem as etapas essenciais na avaliação do sêmen.

Fig. 2.1 Variação do número total de espermatozoides e concentração espermática durante um período de um ano e meio



Total number (10^6)	Número total (10^6)
Concentration (10^6 per ml)	Concentração (10^6 /ml)
Day	Dia

Dados cortesia de Schering Plough e Bayer Schering Pharma AG.

A análise do sêmen envolve as seguintes etapas (descritas em detalhe nas seções subsequentes).

Nos primeiros 5 minutos:

- Colocar o recipiente de amostra na bancada ou em uma incubadora (37 °C) para liquefação.

Entre 30 e 60 minutos:

- Avaliação da liquefação e aparência do sêmen.
- Medição do volume do sêmen.
- Medição do pH do sêmen (se necessário).
- Realização de uma preparação úmida para avaliar a aparência microscópica, a motilidade dos espermatozoides e a diluição necessária para avaliar o número de espermatozoides.
- Avaliação da vitalidade dos espermatozoides (se a porcentagem de células móveis é baixa).
- Realização de esfregaços de sêmen para avaliar a morfologia espermática.
- Realização de diluições de sêmen para avaliar a concentração de espermatozoides.
- Avaliação do número de espermatozoides.
- Realização do teste de reação mista de antiglobulina (MAR) (se necessário).
- Avaliação das células positivas para peroxidase (se células redondas estiverem presentes).
- Preparação dos espermatozoides para o teste da imunoglobulina (se necessário).
- Centrifugação do sêmen (se os marcadores bioquímicos forem analisados).

Dentro das primeiras 3 horas:

- Envio de amostras para o laboratório de microbiologia (se necessário).

Após 4 horas:

- Fixação, coloração e avaliação de esfregaços para morfologia espermática.

Mais tarde no mesmo dia (ou num dia subsequente se as amostras estiverem congeladas):

- Análise de marcadores de glândulas acessórias (se necessário).
- Realização do teste immunobead indireto (se necessário).

2.2 Coleta da amostra

2.2.1 Preparação

- A amostra deve ser coletada em uma sala privada próxima ao laboratório, a fim de limitar a exposição do sêmen às flutuações de temperatura e controlar o tempo entre a coleta e a análise (ver Seções 2.2.5 e 2.2.6 para exceções).

- A amostra deve ser coletada após um mínimo de 2 dias e um máximo de 7 dias de abstinência sexual. Se amostras adicionais forem necessárias, o número de dias de abstinência sexual deve ser o mais constante possível em cada coleta.
- O homem deve receber instruções claras, orais ou escritas, sobre a coleta da amostra de sêmen. Devem enfatizar que a amostra de sêmen precisa estar completa e que o homem deve relatar qualquer perda de qualquer fração da amostra.
- As seguintes informações devem ser registradas no formulário (ver Apêndice 6, seção A6.1): nome, data de nascimento e número de código pessoal, o período de abstinência, a data e hora da coleta, a integridade da amostra, quaisquer dificuldades na produção da amostra e o intervalo entre a coleta e o início da análise do sêmen.

2.2.2 Coleta de sêmen para fins de diagnóstico ou pesquisa

- A amostra deve ser obtida por meio de masturbação e ejaculada em um recipiente limpo, de boca larga, feito de vidro ou plástico, de um lote que tenha sido confirmado como não tóxico para os espermatozoides (ver Quadro 2.1).
- O recipiente para amostras deve ser mantido à temperatura ambiente, entre 20 °C e 37 °C, para evitar grandes mudanças de temperatura que possam afetar os espermatozoides depois de serem ejaculados nele. Deve ser etiquetado com o nome, número de identificação e a data e hora da coleta.
- O recipiente da amostra é colocado na bancada ou em uma incubadora (37 °C) enquanto o sêmen se liquefaz.
- Anotar no relatório se a amostra está incompleta, especialmente se a primeira fração rica em espermatozoides pode estar faltando. Se a amostra estiver incompleta, uma segunda amostra deve ser coletada, novamente, após um período de abstinência de 2 a 7 dias.

Quadro 2.1 Conformidade da compatibilidade dos recipientes de coleta de sêmen

Selecionar várias amostras de sêmen com alta concentração de espermatozoides e boa motilidade espermática. Colocar metade de cada amostra em um recipiente que não seja tóxico (controle) e a outra metade no recipiente que está sendo testado. Avaliar a motilidade dos espermatozoides (ver Seção 2.5) em intervalos de uma hora por repetição à temperatura ambiente ou a 37 °C por 4 horas. Se não houver diferenças em cada ponto de tempo entre as avaliações de controle e teste ($P > 0,05$ em um teste t pareado), os recipientes do teste podem ser considerados não tóxicos para os espermatozoides e para atender aos requisitos de coleta de sêmen.

2.2.3 Coleta estéril de sêmen para reprodução assistida

Isto é feito para a coleta de diagnóstico (veja a Seção 2.2.2), mas os recipientes de amostra, pontas de pipeta e pipetas para mistura devem estar estéreis.

2.2.4 Coleta estéril de sêmen para análise microbiológica

Nesta situação, a contaminação microbiológica de fontes sem sêmen (por exemplo, organismos comensais da pele) deve ser evitada. Os recipientes de amostras, pontas de pipeta e pipetas para mistura devem estar estéreis.

O homem deve:

- Urinar antes da coleta.
- Lavar as mãos e o pênis com sabão, para reduzir o risco de contaminação da amostra com organismos comensais da pele.
- Enxaguar o sabão.
- Secar as mãos e o pênis com uma toalha descartável.
- Ejacular em um recipiente estéril.

Nota: O tempo entre a coleta da amostra de sêmen e o início da investigação pelo laboratório de microbiologia não deve exceder 3 horas.

2.2.5 Coleta de sêmen em casa

- Uma amostra pode ser coletada em casa em circunstâncias excepcionais, como a incapacidade demonstrada de produzir uma amostra por masturbação na clínica ou a falta de instalações adequadas perto do laboratório.
- O homem deve receber instruções claras, orais ou por escrito e faladas, sobre a coleta e o transporte da amostra de sêmen. As instruções devem enfatizar que a amostra de sêmen precisa ser completa, ou seja, que todo o ejaculado deve ser coletado, incluindo a primeira porção, rica em espermatozoides, e que o homem deve relatar qualquer perda de qualquer fração da amostra. Deve ser anotado no relatório se a amostra estiver incompleta.
- O homem deve receber um recipiente pré-identificado, etiquetado com o seu nome e seu número de identificação.
- O homem deve registrar o tempo de produção de sêmen e entregar a amostra ao laboratório dentro de 1 hora após a coleta.
- Durante o transporte para o laboratório, a amostra deve ser mantida entre 20 °C e 37 °C.
- O relatório deve mencionar que a amostra foi coletada em casa ou em outro local fora do laboratório.

2.2.6 Coleta de sêmen com preservativo

- Uma amostra pode ser coletada em um preservativo durante a relação sexual somente em circunstâncias excepcionais, como a incapacidade demonstrada de produzir uma amostra por meio da masturbação.
- Somente preservativos especiais não-tóxicos projetados para coleta de sêmen devem ser usados; tais preservativos estão disponíveis comercialmente.
- O homem deve receber informações do fabricante sobre como usar o preservativo, fechá-lo e enviá-lo ou transportá-lo para o laboratório.
- O homem deve registrar o tempo de produção de sêmen e entregar a amostra ao laboratório dentro de 1 hora após a coleta.

- Durante o transporte para o laboratório, a amostra deve ser mantida entre 20 °C e 37 °C.
- O relatório deve mencionar que a amostra foi coletada por meio de um preservativo especial durante a relação sexual em casa ou em outro local fora do laboratório.

Nota: Preservativos de látex comuns não devem ser usados para coleta de sêmen, pois contêm agentes que interferem na motilidade dos espermatozoides (Jones et al., 1986).

Comentário 1: O coito interrompido não é um meio confiável de coleta de sêmen, pois a primeira porção do ejaculado, que contém o maior número de espermatozoides, pode ser perdida. Além disso, pode haver contaminação celular e bacteriológica da amostra e o baixo pH do fluido vaginal pode afetar adversamente a motilidade dos espermatozoides.

Comentário 2: Se um homem não puder fornecer uma amostra de sêmen, o teste pós-coito (ver Seção 3.3.1) pode fornecer algumas informações sobre seus espermatozoides.

2.2.7 Manipulação segura de amostras

As amostras de sêmen podem conter agentes infecciosos perigosos (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite ou vírus herpes simplex) e devem, portanto, ser tratadas como um risco biológico. Se a amostra for processada para estudo, inseminação intrauterina (IUI), fertilização in vitro (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (ver Seção 5.1) ou se a cultura de sêmen for realizada (ver Seção 2.2.4), materiais e técnicas estéreis devem ser usados. As diretrizes de segurança, conforme descrito no Apêndice 2, devem ser estritamente seguidas; boas práticas de laboratório são fundamentais para a segurança laboratorial (OMS, 2004).

2.3 Exame macroscópico inicial

A análise do sêmen deve começar com uma simples inspeção logo após a liquefação, preferencialmente em 30 minutos, mas não mais do que 1 hora após a ejaculação, para evitar que a desidratação ou mudanças na temperatura afetem a qualidade do sêmen.

2.3.1 Liquefação

Imediatamente após a ejaculação no recipiente de coleta, o sêmen é tipicamente uma massa coagulada semissólida. Dentro de alguns minutos à temperatura ambiente, o sêmen geralmente começa a se liquefazer (tornar-se mais fino), momento em que uma mistura heterogênea de grumos será vista no fluido. À medida que a liquefação continua, o sêmen se torna mais homogêneo e bastante aguado e nos estágios finais apenas pequenas áreas de coagulação permanecem. A amostra faz, geralmente, liquefação completa em 15 minutos à temperatura ambiente, embora raramente possa levar até 60 minutos ou mais. Se a liquefação completa não ocorrer dentro de 60 minutos, deve ser registrado. Amostras de sêmen coletadas em casa, ou por preservativo, normalmente estarão liquefeitas quando chegarem ao laboratório.

As amostras normais de sêmen liquefeito podem conter grânulos tipo gelatina (corpos gelatinosos) que não se liquefazem; estes não parecem ter qualquer significado clínico. A presença de cadeias de muco, no entanto, pode interferir na análise do sêmen.

Nota 1: A liquefação pode ser reconhecida macroscopicamente, conforme descrito acima, e microscopicamente. Os espermatozoides imobilizados ganham a capacidade de se mover à medida que o sêmen se liquefaz. Se os espermatozoides imobilizados são observados no exame microscópico, deve ser dado mais tempo para que o processo de liquefação seja concluído.

Nota 2: Durante a liquefação, uma mistura suave e contínua ou a rotação do recipiente da amostra em um agitador bidimensional, seja à temperatura ambiente ou em uma incubadora ajustada a 37 °C, pode ajudar a produzir uma amostra homogênea.

Nota 3: Se o sêmen não se liquefazer dentro de 30 minutos, não prossiga com a análise, aguarde mais 30 minutos. Se a liquefação não ocorreu dentro de 60 minutos, proceda como descrito na Seção 2.3.1.1.

2.3.1.1 Liquefação retardada

Ocasionalmente, as amostras podem não se liquefazer, dificultando a avaliação do sêmen. Nesses casos, pode ser necessário tratamento adicional, mistura mecânica ou digestão enzimática.

1. Algumas amostras podem ser induzidas a liquefazer pela adição de um volume igual de meio fisiológico (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco); consulte o Apêndice 4, seção A4.2), seguido de pipetagem repetida.
2. A falta de homogeneidade pode ser reduzida pela passagem suave repetida (6–10 vezes) através de uma agulha de calibre 18 (diâmetro interno 0,84 mm) ou um cateter 19 (diâmetro interno 0,69 mm) ligado a uma seringa.
3. A digestão por bromelaína, uma enzima proteolítica de especificidade ampla (EC 3.4.22.32), pode ajudar a promover a liquefação (ver Quadro 2.2).

Quadro 2.2 Preparação de bromelaína

Preparar 10 UI/ml de bromelaína em solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco) (ver apêndice 4, seção A4.2); é difícil dissolver, mas ao misturar a maioria deve dissolver-se dentro de 15 a 20 minutos. Diluir o sêmen 1 + 1 (1: 2) com 10 UI/ml de bromelaína, agitar com a ponta da pipeta e incubar a 37 °C por 10 minutos. Misturar bem a amostra antes de uma análise posterior.

Comentário: Esses tratamentos podem afetar a bioquímica do plasma seminal, a motilidade dos espermatozoides e a morfologia espermática e seu uso deve ser registrado. A diluição 1 + 1 (1: 2) do sêmen com bromelaína deve ser contabilizada no cálculo da concentração de espermatozoides.

2.3.2 Viscosidade do sêmen

Após a liquefação, a viscosidade da amostra pode ser estimada aspirando-a suavemente em uma pipeta descartável de plástico de diâmetro largo (aproximadamente 1,5 mm de diâmetro), permitindo que o sêmen caia pela gravidade e observando o comprimento de qualquer fio. Uma amostra normal deixa a pipeta em pequenas gotas discretas. Se a viscosidade for anormal, a queda formará um fio com mais de 2 cm de comprimento.

Alternativamente, a viscosidade pode ser avaliada introduzindo uma vareta de vidro na amostra e observando o comprimento do fio que se forma após a retirada da vareta. A viscosidade deve ser registrada como anormal quando o fio exceder 2 cm.

Em contraste com uma amostra parcialmente não liquefeita, uma amostra de sêmen viscoso exibe aderência homogênea e sua consistência não irá mudar com o tempo. A alta viscosidade pode ser reconhecida pelas propriedades elásticas da amostra, que adere fortemente a si mesma quando são feitas tentativas para pipetá-la. Os métodos para reduzir a viscosidade são os mesmos que os da liquefação retardada (ver Seção 2.3.1.1).

Comentário: A alta viscosidade pode interferir na determinação da motilidade dos espermatozoides, na concentração de espermatozoides, na detecção de espermatozoides revestidos com anticorpos e na medição de marcadores bioquímicos.

2.3.3 Aparência do ejaculado

Uma amostra normal de sêmen liquefeito tem uma aparência homogênea, cinza e opalescente. Pode parecer menos opaco se a concentração de espermatozoides for muito baixa; a cor também pode ser diferente, isto é, marrom-avermelhada quando as células vermelhas do sangue estão presentes (hematospermia), ou amarela em um homem com icterícia ou tomando certas vitaminas ou drogas.

2.3.4 Volume do sêmen

O volume do ejaculado é fornecido, principalmente, pelas vesículas seminais e a próstata, com uma pequena quantidade das glândulas bulbouretrais e epidídimos. A medição precisa do volume é essencial em qualquer avaliação do sêmen, pois permite calcular o número total de espermatozoides e células não espermáticas no ejaculado.

O volume é medido de uma maneira mais precisa pela pesagem da amostra no recipiente em que é coletada.

- Coletar a amostra em um recipiente descartável, limpo e pré-pesado.
- Pesar o recipiente com sêmen nele.
- Subtrair o peso do recipiente.
- Calcular o volume a partir do peso da amostra, assumindo que a densidade do sêmen seja de 1 g/ml (Auger et al., 1995). A densidade do sêmen varia entre 1,043 e 1,102 g/ml (Huggins et al., 1942; Brazil et al., 2004a; Cooper et al., 2007).

Nota: Recipientes de amostras vazios podem ter pesos diferentes, portanto cada recipiente deve ser previamente pesado individualmente. O peso pode ser registrado no recipiente antes de ser entregue ao cliente. Use uma caneta permanente no próprio recipiente ou em uma etiqueta. Se for usada uma etiqueta para registrar o peso, ela deve ser anexada antes que o recipiente vazio seja pesado.

Alternativamente, o volume pode ser medido diretamente.

- Coletar a amostra diretamente em um cilindro de medição de vidro graduado e modificado com uma boca larga. Estes podem ser obtidos comercialmente.

- Ler o volume diretamente das graduações (precisão de 0,1 ml).

Nota: Medir o volume aspirando a amostra do recipiente em uma pipeta, ou seringa, ou decantando-a em um cilindro de medição, não é recomendado, porque nem toda a amostra será recuperada e, portanto, o volume será subestimado. O volume perdido pode ser entre 0,3 e 0,9 ml (Brazil et al., 2004a; Iwamoto et al., 2006; Cooper et al., 2007).

Comentário 1: O baixo volume de sêmen é característico da obstrução do ducto ejaculatório ou da ausência congênita bilateral do ducto deferente (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; Von Eckardstein et al., 2000; Weiske e cols., 2000), uma condição na qual as vesículas seminais também são pouco desenvolvidas.

Comentário 2: O baixo volume de sêmen também pode ser o resultado de problemas de coleta (perda de uma fração do ejaculado), ejaculação retrógrada parcial ou deficiência androgênica.

Comentário 3: O alto volume de sêmen pode refletir a exsudação ativa em casos de inflamação ativa dos órgãos acessórios.

2.3.4.1 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para o volume de sêmen é de 1,5 ml (5º percentil, intervalo de confiança de 95% (IC) 1,4–1,7).

2.3.5 pH do sêmen

O pH do sêmen reflete o balanço entre os valores de pH das diferentes secreções das glândulas acessórias, principalmente a secreção vesicular seminal alcalina e a secreção prostática ácida. O pH deve ser medido após a liquefação em um tempo uniforme, preferencialmente após 30 minutos, mas em qualquer caso dentro de 1 hora após a ejaculação, uma vez que é influenciado pela perda de CO₂ que ocorre após a produção.

Para amostras normais, deve ser utilizado papel de pH no intervalo de 6,0 a 10,0.

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Espalhar uma gota de sêmen uniformemente sobre o papel de pH.
- Aguardar que a cor da zona impregnada se torne uniforme (<30 segundos).
- Comparar a cor com a faixa de calibração para ler o pH.

Nota: A precisão do papel de pH deve ser verificada em relação aos padrões conhecidos.

Para amostras viscosas, o pH de uma pequena alíquota de sêmen pode ser medido usando um medidor de pH usado para a medição de soluções viscosas. (Haugen & Grotmol, 1998).

2.3.5.1 Valores de referência

Atualmente existem poucos valores de referência para o pH do sêmen de homens férteis. Na pendência de mais dados, este manual retém o valor de consenso de 7,2 como um valor limite mais baixo.

Comentário 1: Se o pH for inferior a 7,0 em uma amostra de sêmen com baixo volume e baixo número de espermatozoides, pode haver obstrução do ducto ejaculatório ou ausência bilateral congênita do ducto deferente (de la Taille et al., 1998; Daudin e col., 2000; Von Eckardstein et al., 2000; Weiske e cols., 2000), uma condição na qual as vesículas seminais também são pouco desenvolvidas.

Comentário 2: O pH do sêmen aumenta com o tempo, à medida que o tamponamento natural diminui, então valores de pH altos fornecem pouca informação clinicamente útil.

2.4 Investigação microscópica inicial

Um microscópio de contraste de fase é recomendado para todos os exames de preparações sem corante de sêmen fresco (consulte o Apêndice 3 para saber como configurar o microscópio). Um exame microscópico inicial da amostra envolve a varredura da preparação com uma ampliação total de $100\times$ (ou seja, uma combinação de uma lente objetiva $\times 10$ com uma lente ocular $10\times$).

Isso fornece uma visão geral da amostra, para revelar:

- Formação de cordões mucosos;
- Agregação ou aglutinação de espermatozoides;
- A presença de células que não sejam espermatozoides, ex. células epiteliais, “células redondas” (leucócitos e células germinais imaturas) e cabeças ou caudas de espermatozoides isolados.

A preparação deve então ser observada com uma ampliação total de $\times 200$ ou $\times 400$ (ou seja, uma combinação de uma objetiva de $\times 20$ ou de $\times 40$ com uma ocular de $\times 10$). Isso permite:

- A avaliação da motilidade dos espermatozoides (ver Seção 2.5);
- A determinação da diluição necessária para uma avaliação precisa do número de espermatozoides (ver Seção 2.8).

2.4.1 Mistura completa e amostragem representativa do sêmen

A natureza do ejaculado liquefeito torna a tomada de uma amostra representativa de sêmen problemática para a análise. Se a amostra não estiver bem misturada, a análise de duas alíquotas separadas pode mostrar diferenças marcantes na motilidade, vitalidade, concentração e morfologia dos espermatozoides. Para ter certeza de obter dados reprodutíveis, a amostra deve ser cuidadosamente misturada antes que as alíquotas sejam tomadas para avaliação (ver Quadro 2.3) e os resultados para alíquotas replicadas devem concordar antes que os valores sejam aceitos. A concordância entre réplicas é determinada para os números de espermatozoides pela distribuição de Poisson (ver Quadros 2.7 e 2.10 e Tabelas 2.4 e 2.5) e para porcentagens pela distribuição binomial (ver Quadros 2.5 e 2.6 e Tabela 2.1).

Quadro 2.3 Mistura completa de sêmen

Antes de remover uma alíquota de sêmen para avaliação, misturar bem a amostra no recipiente original, mas não tão vigorosamente que sejam criadas bolhas de ar. Isto pode ser conseguido aspirando a amostra 10 vezes com uma pipeta descartável de diâmetro largo (aproximadamente 1,5 mm de diâmetro, estéril quando necessário). Não misturar com um misturador de vórtice em alta velocidade, pois isso danificará os espermatozoides.

2.4.2 Fazendo uma preparação úmida

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).

- Remover uma alíquota de sêmen imediatamente após a mistura, não permitindo que os espermatozoides fiquem fora de suspensão.
- Misturar novamente a amostra de sêmen antes de remover as alíquotas replicadas.

O volume de sêmen e as dimensões da lamínula devem ser padronizados, para que as análises sejam realizadas em uma preparação de profundidade fixa de cerca de 20 μm (ver Quadro 2.4), que permite aos espermatozoides nadar livremente:

- Colocar um volume padrão de sêmen, por ex. 10 μl , em uma lâmina de vidro limpo.
- Cobrir com uma lamínula, por exemplo 22 mm \times 22 mm para 10 μl , para fornecer uma câmara com aproximadamente 20 μm de profundidade (ver Caixa 2.4). O peso da lamela espalha a amostra.
- Tomar cuidado para evitar a formação e aprisionamento de bolhas de ar entre a lamela e o escorregador.
- Avaliar a preparação úmida, acabada de fazer, logo que o conteúdo já não esteja à deriva.

Quadro 2.4 Profundidade das preparações úmidas

A profundidade de uma preparação (D , μm) é obtida dividindo o volume da amostra (V , $\mu\text{l} = \text{mm}^3$) pela área sobre a qual é espalhada (A , mm^2): $D = V/A$. Assim, um volume de 10 μl de sêmen aplicado em um escorregador de vidro limpo e coberto com uma lamela de 22 mm \times 22 mm (área 484 mm^2) proporciona uma câmara com uma profundidade de 20,7 μm ; uma amostra de 6,5 μl coberta com uma lamela de 18 mm \times 18 mm (área 324 mm^2) fornece uma profundidade de 20,1 μm ; uma amostra de 11 μl coberta por uma lamela de 21 mm \times 26 mm (área 546 mm^2) fornece uma profundidade de 20,1 μm . Ocasionalmente, uma câmara mais profunda pode ser necessária: uma amostra de 40 μl coberta por uma lamela de 24 mm \times 50 mm (área de 1200 mm^2) fornece uma profundidade de 33,3 μm .

Nota 1: Uma profundidade de câmara inferior a 20 μm restringe o movimento de rotação dos espermatozoides (Le Lannou et al., 1992; Kraemer et al., 1998).

Nota 2: Se a câmara for muito profunda, será difícil avaliar os espermatozoides à medida que eles entram e saem do foco.

Nota 3: Se o número de espermatozoides por campo visual varia consideravelmente, a amostra não é homogênea. Nestes casos, a amostra de sêmen deve ser novamente misturada (ver Caixa 2.3) e uma nova lâmina deve ser preparada.

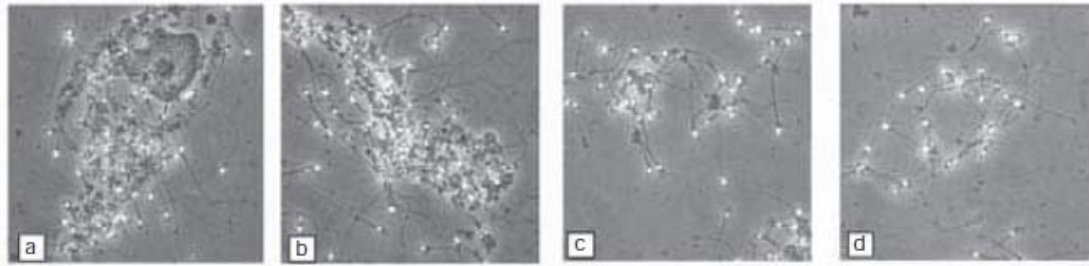
Nota 4: A falta de homogeneidade também pode resultar da consistência anormal, liquefação anormal (ver Seção 2.3.1), agregação de espermatozoides (ver Seção 2.4.3) ou aglutinação de espermatozoides (ver Seção 2.4.4).

2.4.3 Agregação de espermatozoides

A aderência de espermatozoides imóveis entre si ou de espermatozoides móveis a cordões de muco, células não espermáticas ou detritos é considerada como agregação não específica (Fig. 2.2) e deve ser registrada como tal.

Fig. 2.2 Agregação não específica de espermatozoides no sêmen

Pontos de vista dos espermatozoides agregados com uma célula epitelial (a), detritos (b) ou espermatozoides (c, d).



Micrografias cortesia de C Brazil.

2.4.4 Aglutinação de espermatozoides

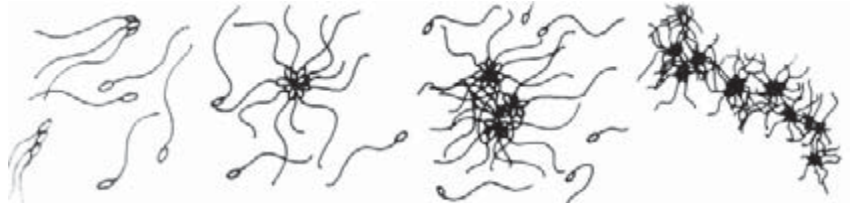




A aglutinação refere-se especificamente a espermatozoides móveis colados uns aos outros, cabeça a cabeça, cauda a cauda ou de uma maneira mista. A motilidade é muitas vezes vigorosa com um movimento de agitação frenético, mas às vezes os espermatozoides estão tão aglutinados que seu movimento é limitado. Quaisquer espermatozoides móveis que se coleem uns aos outros por suas cabeças, caudas ou peças intermediárias devem ser anotados.

O tipo principal de aglutinação (refletindo o grau (graus 1-4) e o local do anexo (graus A – E) deve ser registrado (Rose et al., 1976) (ver Fig. 2.3):

- Grau 1: isolado <10 espermatozoides por aglutinado, muitos livres
- Grau 2: moderado 10–50 espermatozoides por aglutinado, livres
- Grau 3: grande aglutinados de >50 espermatozoides, alguns ainda livres
- Grau 4: grosso todos os espermatozoides aglutinados e grupos aglutinados interligados

Nota: Os espermatozoides móveis presos às células, ou detritos, ou espermatozoides imóveis presos um ao outro (agregação) não devem ser classificados como aglutinação.

Fig. 2.3 Diagrama esquemático de diferentes extensões de aglutinação de espermatozoides

Partes envolvidas	Grau de aglutinação			
	1. Isolado (<10 espermatozoide s/grupo aglutinado, muitos espermatozoide s livres)	2. Moderado (10–50 espermatozoide s/grupo aglutinado, esperma livre)	3. Grande (> 50 espermatozoide s/grupo aglutinado, alguns espermatozoide s ainda estão livres)	4. Grosso (todos os espermatozoide s aglutinados e grupos aglutinados interligados)
A. Cabeça a cabeça				
B. Cauda-a-cauda (cabeças são vistas livres e se movem sem aglutinar)				
C. Ponta da cauda à ponta da cauda				
D. Misturado (aglutinações cabeça-a-cabeça e cauda-a-cauda claras)				
E. Emaranhado (cabeças e caudas enredadas. As cabeças não estão livres de aglutinações, pois estão em aglutinação cauda-a-cauda)				

Reproduzido de Rose et al. (1976) com permissão de Wiley-Blackwell.

Comentário 1: A presença de aglutinação não é evidência suficiente para deduzir uma causa imunológica de infertilidade, mas é sugestiva da presença de anticorpos antiespermatozoides; mais testes são necessários (ver Seção 2.20).

Comentário 2: Aglutinação severa pode afetar a avaliação da motilidade e concentração espermática.

2.4.5 Elementos celulares não espermáticos

O ejaculado contém outras células além dos espermatozoides, algumas das quais podem ser clinicamente relevantes. Estes incluem células epiteliais do trato geniturinário, bem como leucócitos e células germinativas imaturas, as duas últimas coletivamente referidas como “células redondas” (Johanisson et al., 2000). Elas podem ser identificadas examinando um esfregaço corado em uma ampliação de $\times 1000$ (consulte a Seção 2.12, as Placas 13 e 14 e a Seção 2.19). Essas células podem ser identificadas e quantificadas com maior precisão pela detecção da atividade da peroxidase (ver Seção 2.18) ou do antígeno CD45 (ver Seção 3.2). Sua concentração pode ser estimada utilizando-se da mesma técnica para a contagem dos espermatozoides, a partir de preparações úmidas (ver Seção 2.18.1.5) ou da razão entre essas células e o número de espermatozoides no esfregaço corado e na concentração espermática (ver Seção 2.12.1).

2.5 Motilidade espermática

A extensão da motilidade espermática progressiva (ver Seção 2.5.1) está relacionada às taxas de gravidez (Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000). Os métodos de avaliação da motilidade envolvendo análise de esperma assistida por computador (CASA) são descritos na Seção 3.5.2.

A motilidade espermática no sêmen deve ser avaliada o mais rápido possível após a liquefação da amostra, preferencialmente aos 30 minutos, mas em qualquer caso dentro de 1 hora após a ejaculação, para limitar os efeitos deletérios da desidratação, pH ou mudanças de temperatura na motilidade.

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Remover uma alíquota de sêmen imediatamente após a mistura, não permitindo que os espermatozoides fiquem fora de suspensão.
- Misturar novamente a amostra de sêmen antes de remover a alíquota replicada.
- Para cada réplica, preparar uma preparação úmida com aproximadamente 20 μm de profundidade (ver Seção 2.4.2).
- Esperar a amostra parar de derivar (dentro de 60 segundos).
- Examinar a lâmina com ótica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
- Avaliar aproximadamente 200 espermatozoides por repetição para a porcentagem de diferentes categorias móveis.
- Comparar os valores da réplica para verificar se eles estão bem próximos. Se assim for, continuar com os cálculos; se não, preparar novas amostras.

Nota 1: O procedimento pode ser realizado à temperatura ambiente ou a 37 °C com um microscópio aquecido, mas deve ser padronizado para cada laboratório. Se a motilidade dos espermatozoides for avaliada a 37 °C, a amostra deve ser incubada a esta temperatura e a preparação feita com lâminas e laminulas pré-aquecidas.

Nota 2: Recomenda-se o uso de uma lente ocular com grade (ver Fig. 2.4a) para limitar a área visualizada. Isso permite que a mesma área da lâmina seja avaliada durante os dois estágios da pontuação. Avalie primeiro a motilidade progressiva, depois a motilidade e a imotilidade não progressivas (ver Seção 2.5.1). Limitar a área, e assim o número de espermatozoides avaliados, assegura que várias áreas da preparação sejam examinadas quanto à motilidade.

2.5.1 Categorias de movimento de esperma

Recomenda-se um sistema simples de classificação da motilidade que distinga os espermatozoides com motilidade progressiva ou não progressiva daqueles que

são imóveis. A motilidade de cada espermatozoide é classificada da seguinte forma:

- Motilidade progressiva (PR): espermatozoides que se movem ativamente, seja linearmente ou em um grande círculo, independentemente da velocidade.
- Motilidade não progressiva (NP): todos os outros padrões de motilidade com ausência de progressão, ex. nadando em pequenos círculos, a força flagelar dificilmente deslocando a cabeça, ou quando somente uma batida flagelar pode ser observada.
- Imotilidade (IM): sem movimento.

Comentário 1: A edição anterior deste manual recomendava que os espermatozoides progressivamente móveis fossem classificados em rápidos ou lentos, com velocidade $>25 \mu\text{m}/\text{seg}$ a 37°C , definindo os espermatozoides “grau a”. No entanto, é difícil para os técnicos definirem a progressão para a frente com tanta exatidão sem viés (Cooper & Yeung, 2006).

Comentário 2: Ao discutir a motilidade dos espermatozoides é importante especificar a motilidade total (PR + NP) ou a motilidade progressiva (PR).

2.5.2 Preparando e avaliando uma amostra para motilidade

- Se a motilidade for avaliada a 37°C , ligar o aquecedor de lâminas com 10 minutos de antecedência para permitir que a temperatura se estabilize.
- Preparar uma preparação úmida de $20 \mu\text{m}$ de profundidade (ver Seção 2.4.2).
- Examinar a lâmina com ótica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
- Esperar a amostra parar de derivar.
- Procurar espermatozoides em uma área de pelo menos 5 mm da borda da laminula (ver Fig. 2.4b), para evitar a observação dos efeitos da secagem na motilidade.
- Vasculhar sistematicamente a lâmina para evitar a exibição repetida da mesma área.
Mudar os campos com frequência. Evitar escolher campos com base no número de espermatozoides móveis visto (a escolha do campo deve ser aleatória).
- Começar a marcar um determinado campo em um instante aleatório. Não espere que os espermatozoides entrem no campo ou na grade para começar a pontuar.
- Avaliar a motilidade de todos os espermatozoides dentro de uma área definida do campo. Isto se faz mais facilmente usando uma lente ocular (ver Fig. 2.4a). Selecionar a parte do campo ou grelha a ser pontuada a partir da concentração espermática, ou seja, marcar apenas a linha superior da grelha se a concentração de espermatozoides for alta; marcar toda a grelha se a concentração de espermatozoides for baixa.
- Vasculhar e contar rapidamente para evitar superestimar o número de espermatozoides móveis. O objetivo é contar todos os espermatozoides móveis na seção da grade instantaneamente; evitar a contagem dos presentes inicialmente mais aqueles que nadam na seção da grade durante a pontuação, o que influenciaria o resultado em favor dos espermatozoides móveis.
- Inicialmente, vasculhar a seção da grade que está sendo pontuada para as células PR (veja a Seção 2.5.1). Em seguida, contar os espermatozoides NP e finalmente os espermatozoides IM na mesma seção da grade. Com experiência, pode ser possível pontuar todas as três categorias de movimento de espermatozoides de uma vez só e marcar as maiores áreas da grade.

- Registrar o número de espermatozoides em cada categoria de mobilidade com o auxílio de um contador de laboratório.
- Avaliar pelo menos 200 espermatozoides num total de pelo menos cinco campos em cada réplica, para obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
- Calcular a porcentagem média e a diferença entre as duas porcentagens para o grau de motilidade mais frequente (PR, NP ou IM) nas preparações úmidas replicadas.
- Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Em cada mostra, a diferença máxima entre duas porcentagens que se espera que ocorra em 95% das amostras é devido ao erro de amostragem isolado).
- Se a diferença entre as porcentagens for aceitável, relatar a porcentagem média para cada grau de motilidade (PR, NP e IM). Se a diferença for muito alta, pegar duas novas alíquotas da amostra de sêmen, fazer duas novas preparações e repetir a avaliação (ver Quadro 2.6).
- Relatar a porcentagem média de cada grau de motilidade para o número inteiro mais próximo.

Nota 1: Avalie apenas os espermatozoides intactos (definidos como tendo uma cabeça e uma cauda; veja a Seção 2.7.3), uma vez que apenas os espermatozoides intactos são contados para a concentração espermática. Não conte cabeças de alfinete móveis.

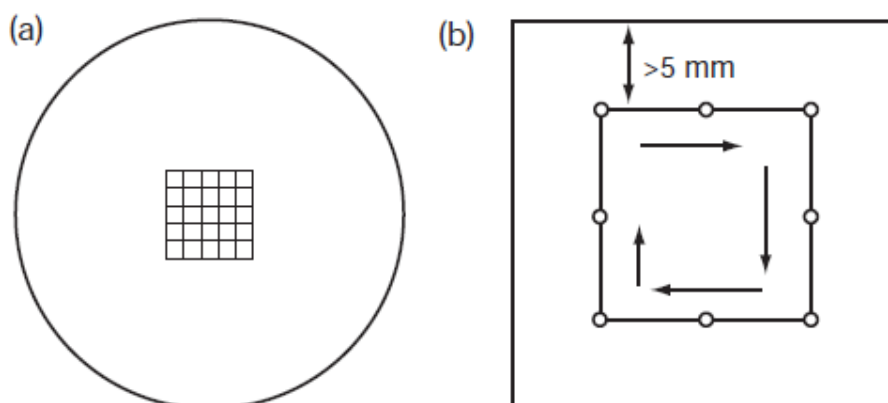
Nota 2: Se os espermatozoides estão sendo pontuados em dois estágios (ex. PR primeiro, seguido por NP e IM da mesma área) e uma contagem de 200 espermatozoides é alcançada antes que todas as categorias de motilidade daquela área tenham sido pontuadas, a contagem deve continuar além de 200 espermatozoides até que todas as categorias tenham sido contadas, a fim de evitar viés em relação à categoria de motilidade pontuada primeiro.

Nota 3: É comum superestimar a motilidade dos espermatozoides, mas isso muitas vezes pode ser evitado invertendo a ordem da análise (NP e IM primeiro), usando uma lente ocular reticulada e estando ciente de, e evitando, na medida do possível, potenciais fontes de viés (veja a Seção 7.13.3).

Nota 4: Em raras ocasiões, com amostras não homogêneas, até mesmo um terceiro conjunto de réplicas pode fornecer diferenças inaceitáveis. Nesse caso, calcule a média de todas as réplicas e observe isso no relatório.

Fig. 2. 4 Dicas para avaliar a motilidade dos espermatozoides

- (a) Uma lente ocular reticulada facilita a contagem de espermatozoides móveis e imóveis.
 (b) Seleção sistemática dos campos para avaliação da motilidade dos espermatozoides, a pelo menos 5 mm das margens da lamínula.



Quadro 2.5 Erros na estimativa de porcentagens

Quão precisa é a sua estimativa de uma porcentagem depende não apenas do número (N) de espermatozoides contados, mas também da porcentagem verdadeira (mas desconhecida) (p) (distribuição binomial). O erro padrão aproximado (EP) é $\sqrt{(p(100-p))/N}$ para porcentagens entre 20 e 80. Fora desse intervalo, um método mais apropriado para usar é a transformação angular (raiz quadrada de arco seno), $z = \sin^{-1}\sqrt{(p/100)}$, com um desvio padrão de $1/(2\sqrt{N})$ radianos, que depende apenas do número de espermatozoides contados e não da verdadeira porcentagem.

Tabela 2.1 Diferenças aceitáveis entre duas porcentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 200 espermatozoides (total de 400 contados)

Média (%)	Diferença Aceitável*	Média (%)	Diferença Aceitável*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

Quadro 2.6 Comparação de porcentagens replicadas

As porcentagens devem ser arredondadas para o número inteiro mais próximo. A convenção é arredondar 0,5% para o número par mais próximo, por ex. 32,5% é arredondado para 32%, mas 3,5% é arredondado para 4%. Observe que os percentuais arredondados podem não totalizar 100%.

Se a diferença entre as porcentagens replicadas for menor ou igual àquela indicada na Tabela 2.1 para a média dada, as estimativas são aceitas e a média é tomada como resultado.

Diferenças maiores do que as aceitáveis sugerem que houve erro de contagem ou erros de pipetagem, ou que as células não foram bem misturadas, com distribuição não aleatória na câmara ou na lâmina.

Quando a diferença entre porcentagens for maior que aceitável, descarte os dois primeiros valores e reavalie. (Não conte uma terceira amostra e tome a média dos três valores ou tome a média dos dois valores mais próximos.)

Para estimativas da motilidade dos espermatozoides, ou vitalidade apenas pela eosina e pelo teste hipoosmótico (HOS), prepare réplicas novas a partir de novas alíquotas de sêmen. Para estimativas de vitalidade dos esfregaços de eosina-nigrosina e morfologia espermática, reavalie as lâminas em réplica.

Com esses valores de corte de IC de 95%, aproximadamente 5% dos replicados estarão fora dos limites apenas por acaso (ver Apêndice 7, seção A7.3). Os limites exatos de confiança binomial agora podem ser gerados por computador, e estes são usados neste manual para os gráficos e tabelas fornecidos para avaliar a concordância dos replicados.

2.5.3 Exemplos práticos

Exemplo 1. Estimativas de motilidade espermática em contagens replicadas de 200 espermatozoides são: progressivos, 30% e 50%; não progressivos, 5% e 15%; imóveis, 65% e 35%. A categoria mais comum é a imotilidade, com uma média de 50% e uma diferença de 30%. Na Tabela 2.1 vê-se que, para uma média de 50%, seria esperada uma diferença de até 10% apenas por acaso. Como a

diferença observada é excedida, os resultados são descartados e duas lâminas novas são preparadas e a motilidade espermática é reestimada.

Exemplo 2. Estimativas de motilidade espermática em contagens replicadas de 200 espermatozoides são: progressivos, 37% e 28%; não progressivos, 3% e 6%; imóveis, 60% e 66%. A categoria mais comum é a imotilidade, com uma média de 63% e uma diferença de 6%. Na Tabela 2.1 vê-se que, para uma média de 63%, seria esperada uma diferença de até 10% apenas por acaso. Como a diferença observada é menor do que isso, os resultados são aceitos e os valores médios relatados: RP 32%, NP 4%, IM 63%.

2.5.4 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para motilidade total (RP + NP) é de 40% (5º percentil, IC 95% 38-42).

O limite inferior de referência para motilidade progressiva (RP) é de 32% (5º percentil, IC 95% 31-34).

Comentário: O número total de espermatozoides progressivamente móveis no ejaculado é de significância biológica. Isto é obtido pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado (ver Seção 2.8.7) pela percentagem de células progressivamente móveis.

2.6 Vitalidade do espermatozoide

A vitalidade dos espermatozoides, estimada pela avaliação da integridade das membranas das células, pode ser determinada rotineiramente em todas as amostras, mas é especialmente importante para amostras com menos de cerca de 40% de espermatozoides progressivamente móveis. Este teste pode fornecer uma verificação da avaliação da motilidade, uma vez que a porcentagem de células mortas não deve exceder (dentro do erro de amostragem) a porcentagem de espermatozoides imóveis. A porcentagem de células viáveis normalmente excede a das células móveis.

A percentagem de espermatozoides vivos é avaliada identificando aqueles com uma membrana celular intacta, a partir da exclusão de corante ou por inchamento hipotônico. O método de exclusão de corantes baseia-se no princípio de que as membranas plasmáticas danificadas, como as encontradas em células não vitais (mortas), permitem a entrada de corantes impermeáveis à membrana. O teste hipoosmótico supõe que somente as células com membranas intactas (células vivas) irão inchar em soluções hipotônicas. Exemplos de cada teste são descritos abaixo.

A vitalidade espermática deve ser avaliada o mais rapidamente possível após a liquefação da amostra de sêmen, preferencialmente aos 30 minutos, mas em qualquer caso dentro de 1 hora da ejaculação, para evitar a observação dos efeitos deletérios da desidratação ou das mudanças de temperatura na vitalidade.

Comentário 1: É clinicamente importante saber se os espermatozoides imóveis estão vivos ou mortos. Os resultados de vitalidade devem ser avaliados em conjunto com os de motilidade da mesma amostra de sêmen.

Comentário 2: A presença de uma grande proporção de células vivas, mas imóveis, pode ser indicativa de defeitos estruturais no flagelo (Chemes & Rawe, 2003); uma alta porcentagem de células imóveis e não vivas (necrozoospermia) pode indicar patologia epididimária (Wilton et al.,

1988; Correa-Perez et al., 2004).

2.6.1 Teste de vitalidade usando eosina-nigrosina

Esta técnica de coloração de uma etapa usa nigrosina para aumentar o contraste entre o fundo e as cabeças dos espermatozoides, o que os torna mais fáceis de discernir. Também permite que as lâminas sejam armazenadas para fins de reavaliação e controle de qualidade (Björndahl et al., 2003).

2.6.1.1 Preparado dos reagentes

1. Eosina Y: dissolver 0,67 g de eosina Y (índice de cor 45380) e 0,9 g de cloreto de sódio (NaCl) em 100 ml de água purificada com aquecimento suave.
2. Eosina-nigrosina: adicionar 10 g de nigrosina (índice de cor 50420) à solução de 100 ml de eosina Y.
3. Ferver a suspensão e deixar esfriar até a temperatura ambiente.
4. Filtrar através de papel de filtro (por exemplo, 90 g/m²) para remover os precipitados grosseiros e gelatinosos e armazenar em um frasco de vidro escuro selado.

2.6.1.2 Procedimento

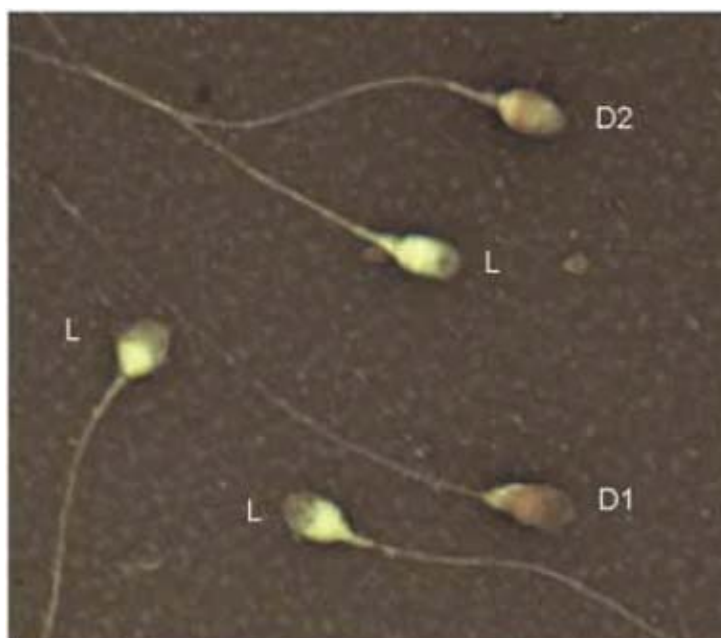
1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Remover uma alíquota de 50 µl de sêmen e misturar com um volume igual de suspensão de eosina-nigrosina, por ex. em uma placa de porcelana ou tubo de ensaio, e aguardar 30 segundos.
3. Misturar novamente a amostra de sêmen antes de remover uma alíquota replicada, misturar com eosina-nigrosina e tratar como na etapa 2 acima.
4. Para cada suspensão, fazer um esfregaço em uma lâmina de vidro (consulte a Seção 2.13.2) e deixar secar ao ar.
5. Examinar imediatamente após a secagem ou posteriormente após a montagem com um meio de montagem não aquoso permanente (consulte a Seção 2.14.2.5).
6. Examinar cada lâmina com óptica de campo claro com ampliação × 1000 e imersão em óleo.
7. Registrar o número de células coradas (mortas) ou não coradas (vitais) com o auxílio de um contador de laboratório.
8. Avaliar 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
9. Calcular a média e a diferença das duas porcentagens de células vitais das lâminas replicadas.
10. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Em cada mostra, a diferença máxima entre duas porcentagens

que se espera que ocorra em 95% das amostras é devido ao erro de amostragem isolado).

11. Se a diferença entre as porcentagens for aceitável, relatar a porcentagem média de espermatozoides vitais. Se a diferença for muito alta, fazer duas novas preparações a partir de duas alíquotas frescas da amostra de sêmen e repetir a avaliação (ver Quadro 2.6).
12. Relatar a porcentagem média de espermatozoides vitais para o número inteiro mais próximo.

Fig. 2.5 Esfregaço de eosina-nigrosina observado em óptica de campo claro

Espermatozoides com cabeça vermelha (D1) ou rosa-escuro (D2) são considerados mortos (dano na membrana), enquanto espermatozoides com cabeça branca (L) ou cabeça rosa-claro são considerados vivos (membrana intacta).



Micrografia cortesia de TG Cooper.

2.6.1.3 Pontuação

1. A nigrosina fornece um fundo escuro que facilita discernir espermatozoides manchados fracamente.
2. Com a óptica de campo claro, os espermatozoides vivos têm as cabeças brancas e os espermatozoides mortos têm as cabeças manchadas de vermelho ou rosa-escuro (Fig. 2.5). Os espermatozoides com uma cabeça rosa-fraco são avaliados como vivos.
3. Se o corante é limitado apenas a uma parte da região do pescoço, e o resto da área da cabeça não é corada, é considerado como uma "membrana do pescoço com vazamento", não um sinal de morte celular e desintegração total da membrana. Estas células devem ser avaliadas como vivas.

2.6.1.4 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para vitalidade (membrana intacta dos espermatozoides) é de 58% (5º percentil, IC 95% 55-63).

Comentário: O número total de espermatozoides com a membrana intacta no ejaculado é de significância biológica. Isto é obtido pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado (ver Seção 2.8.7) pela percentagem de célula com membrana intacta.

2.6.2 Teste de vitalidade usando apenas eosina

Este método é simples e rápido, mas as preparações úmidas não podem ser armazenadas para fins de controle de qualidade.

2.6.2.1 Preparado dos reagentes

1. NaCl, 0,9% (p/v): dissolver 0,9 g de NaCl em 100 ml de água purificada.
2. Eosina Y, 0,5% (p/v): dissolver 0,5 g de eosina Y (índice de cor 45380) em 100 ml de NaCl 0,9%.

Nota: Algumas soluções de eosina, disponíveis comercialmente, são aquosas hipotônicas que enfatizarão os espermatozoides e darão resultados falso-positivos (Björndahl et al., 2004). Se usar essa solução, adicionar 0,9 g de NaCl a 100 ml de solução para aumentar a osmolalidade.

2.6.2.2 Procedimento

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Remover uma alíquota de 5 µl de sêmen e combinar com 5 µl de solução de eosina em uma lâmina de microscópio. Misturar com a ponta de uma pipeta, agitando a amostra na lâmina.
3. Cobrir com uma lamela de 22 mm x 22 mm e deixar por 30 segundos.
4. Misturar novamente a amostra de sêmen, remover uma alíquota replicada, misturar com eosina e tratar como nas etapas 2 e 3 acima.
5. Examinar cada lâmina, de preferência com óptica de contraste de fase negativa (o contraste de fase positivo faz com que as cabeças rosa-fraco sejam difíceis de discernir) com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
6. Registrar o número de células coradas (mortas) e não coradas (vitais) com o auxílio de um contador de laboratório.
7. Avaliar 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
8. Calcular a média e a diferença das duas percentagens de células vitais das preparações replicadas.
9. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Em cada amostra, a diferença máxima entre duas percentagens que se espera que ocorra em 95% das amostras é devido ao erro de amostragem isolado).
10. Se a diferença entre as percentagens for aceitável, relatar a percentagem média de vitalidade. Se a diferença for muito alta, fazer duas novas

preparações a partir de duas alíquotas de sêmen e repetir a avaliação (ver Quadro 2.6).

11. Relatar a porcentagem média de espermatozoides vitais para o número inteiro mais próximo.

2.6.2.3 Pontuação

1. Os espermatozoides vivos têm cabeça branca ou rosa-claro e os espermatozoides mortos têm as cabeças manchadas de vermelho ou rosa-escuro.
2. Se o corante é limitado apenas a uma parte da região do pescoço, e o resto da área da cabeça não é corada, é considerado como uma "membrana do pescoço com vazamento", não um sinal de morte celular e desintegração total da membrana. Estas células devem ser avaliadas como vivas.
3. Se for difícil discernir a cabeça rosa-pálido, use nigrosina para aumentar o contraste do fundo (veja a Seção 2.6.1).

2.6.2.4 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para vitalidade (membrana intacta dos espermatozoides) é de 58% (5º percentil, IC 95% 55-63).

Comentário: O número total de espermatozoides com a membrana intacta no ejaculado é de significância biológica. Isto é obtido pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado (ver Seção 2.8.7) pela percentagem de célula com membrana intacta.

2.6.3 Teste de vitalidade usando inchaço hipoosmótico

Como alternativa à exclusão de corantes, o teste hipoosmótico (HOS) pode ser usado para avaliar a vitalidade (Jeyendran et al., 1984). É útil quando a coloração dos espermatozoides deve ser evitada, ex. ao escolher espermatozoides para ICSI. Os espermatozoides com membranas intactas incham em 5 minutos em meio hipoosmótico e todas as formas flagelares são estabilizadas em 30 minutos (Hossain et al., 1998).

Então, usar:

- 30 minutos de incubação para diagnósticos de rotina; mas
- 5 minutos de incubação quando os espermatozoides são processados para uso terapêutico.

2.6.3.1 Preparado dos reagentes

1. Solução de inchaço para fins de diagnóstico: dissolver 0,735 g de citrato de sódio di-hidratado e 1,351 g de D-frutose em 100 ml de água purificada. Congelar alíquotas de 1 ml desta solução a -20 °C.
2. Para uso terapêutico: diluir o meio a ser utilizado 1 + 1 (1: 2) com água purificada estéril.

2.6.3.2 Procedimento

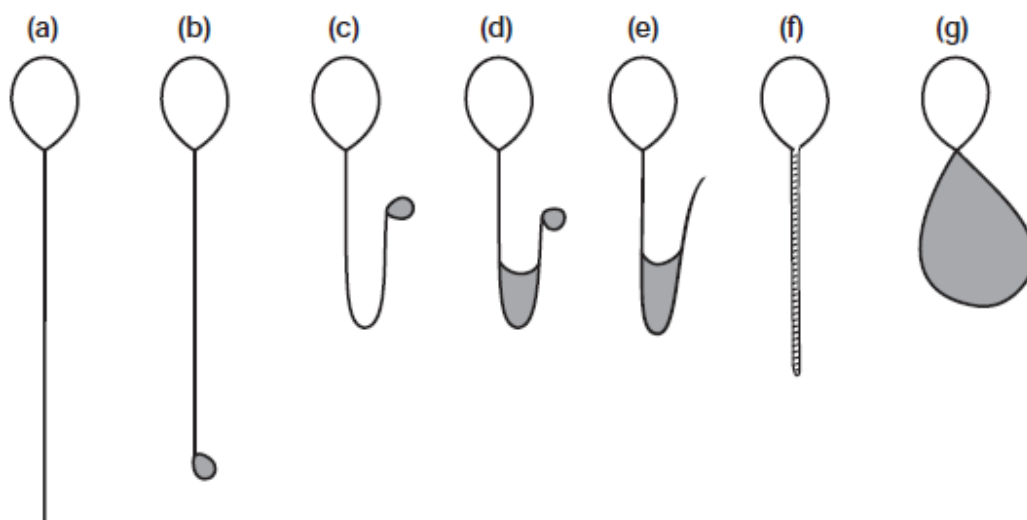
1. Descongelar a solução de inchamento congelada e misturar bem antes de usar.
2. Aquecer 1 ml de solução de inchamento ou 1 ml de meio diluído 1 + 1 (1: 2) em um tubo de microcentrifuga fechado a 37 °C durante 5 minutos.
3. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
4. Remover uma alíquota de 100 µl de sêmen e adicionar à solução de inchamento. Misturar delicadamente, puxando-o para dentro e para fora da pipeta.
5. Incubar a 37 °C por exatamente 5 minutos ou 30 minutos (veja acima), depois transferir uma alíquota de 10 µl para uma lâmina limpa e cobrir com uma lamínula de 22 mm x 22 mm.
6. Misturar novamente a amostra de sêmen, remover uma alíquota replicada, misturar com solução de inchamento, incubar e preparar uma lâmina replicada, como mostrado acima.
7. Examinar cada lâmina com ótica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
8. Registrar o número de células não inchadas (mortas) e inchadas (vitais) com o auxílio de um contador de laboratório.
9. Avaliar 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
10. Calcular a média e a diferença das duas percentagens de células vitais das preparações replicadas.
11. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Em cada amostra, a diferença máxima entre duas percentagens que se espera que ocorra em 95% das amostras é devido ao erro de amostragem isolado).
12. Se a diferença entre as percentagens for aceitável, relatar a percentagem média de vitalidade. Se a diferença for muito alta, fazer duas novas preparações a partir de duas alíquotas de sêmen e repetir a avaliação (ver Quadro 2.6).
13. Relatar a percentagem média de espermatozoides vitais para o número inteiro mais próximo.

2.6.3.3 Pontuação

1. Os espermatozoides inchados são identificados por mudanças na forma da célula, como indicado pelo enrolamento da cauda (Fig. 2.6).
2. As células vivas são distinguidas pela evidência de inchaço da cauda do espermatozoide; pontuar todas as formas de caudas inchadas como espermatozoides vivos.

Fig. 2.6 Representação esquemática de alterações morfológicas típicas em espermatozoides humanos submetidos a estresse hipoosmótico

(a) Nenhuma mudança. (b) - (g) Vários tipos de mudanças na cauda. Inchaço na cauda é indicado pela área cinzenta.



Reproduzido de Jeyendran RS, de Van der Ven HH, de Perez-Pelaez M, de Crabo BG, de Zaneveld LJD.(1984) *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.© Sociedade para a Reprodução e Fertilidade (1984). Reproduzido com permissão.

2.6.3.4 Limite inferior de referência

Os valores do teste HOS aproximam-se àqueles do teste de eosina (Carreras et al., 1992).

O limite inferior de referência para vitalidade (membrana intacta dos espermatozoides) é de 58% (5º percentil, IC 95% 55-63).

Comentário: O número total de espermatozoides com a membrana intacta no ejaculado é de significância biológica. Isto é obtido pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado (ver Seção 2.8.7) pela percentagem de célula com membrana intacta.

2.7 Número de espermatozoides

O número total de espermatozoides por ejaculado e a concentração espermática estão relacionados ao tempo até a gravidez (Slama et al., 2002) e às taxas de gravidez (OMS, 1996; Zinaman et al., 2000) e são preditores de gravidez (Bonde et al., 1998; Larsen et al., 2000). São necessários mais dados correlacionando números totais de espermatozoides com resultados reprodutivos.

O número de espermatozoides no ejaculado é calculado a partir da concentração de espermatozoides, que é medida durante a avaliação do sêmen. Para ejaculados normais, quando o trato masculino é desobstruído e o tempo de abstinência é curto, o número total de espermatozoides no ejaculado é correlacionado com o volume testicular (Handelsman et al., 1984; OMS, 1987; Andersen et al., 2000; Behre et al., 2000) e, portanto, é uma medida da capacidade dos testículos em produzir espermatozoides (MacLeod & Wang, 1979) e na patência do trato masculino. A concentração de espermatozoides no sêmen, embora relacionada às taxas de fertilização e gravidez, é influenciada pelo volume das secreções das vesículas seminais e da próstata (Eliasson, 1975) e não é uma medida específica da função testicular.

Comentário 1: Os termos “número total de espermatozoides” e “concentração de espermatozoides” não são sinônimos. A concentração de espermatozoides refere-se ao número de espermatozoides por unidade de volume de sêmen e é uma função do número de espermatozoides emitidos e do volume de fluido que os dilui. O número total de espermatozoides refere-se ao número total de espermatozoides em todo o ejaculado e é obtido pela multiplicação da concentração de espermatozoides pelo volume de sêmen.

Comentário 2: A generalização de que o número total de espermatozoides reflete a produtividade dos espermatozoides testiculares pode não ser suficiente para eletro-ejaculados de homens com lesão medular, aqueles com deficiência androgênica ou para amostras coletadas após abstinência prolongada ou ejaculação retrógrada parcial.

Comentário 3: O termo “densidade do esperma” (massa por unidade de volume) não deve ser usado quando se quer dizer concentração de espermatozoides (número por unidade de volume).

A determinação do número de espermatozoides compreende os seguintes passos (que são descritos detalhadamente nas seções subsequentes).

- Examinar uma preparação bem misturada e não diluída de sêmen liquefeito em uma lâmina de vidro sob uma lamela, para determinar a diluição apropriada e as câmaras apropriadas a serem usadas (consulte a Seção 2.8.1). Esta é geralmente a preparação úmida (ver Seção 2.4.2) usada para avaliação da motilidade.
- Misturar o sêmen e preparar diluições com fixador.
- Carregar a câmara do hemocítmetro e deixar os espermatozoides assentarem em uma câmara úmida.
- Avaliar as amostras dentro de 10 a 15 minutos (após o qual a evaporação tem efeitos perceptíveis na posição dos espermatozoides dentro da câmara).
- Contar pelo menos 200 espermatozoides por replicado.
- Comparar as contagens replicadas para ver se estão bem próximas. Se assim for, proceder com os cálculos; se não, preparar novas diluições.
- Calcular a concentração em espermatozoides por ml.
- Calcular o número total de espermatozoides por ejaculação.

2.7.1 Tipos de câmara de contagem

Recomenda-se o uso de hemocítmetros de 100 µm de profundidade. Fatores de diluição para a câmara de contagem Neubauer melhorada são dados aqui. Outras câmaras profundas de contagem podem ser usadas, mas elas terão diferentes volumes e padrões de grade e exigirão diferentes fatores para o cálculo. Câmaras descartáveis estão disponíveis para determinar a concentração de espermatozoides (Seaman et al., 1996; Mahmoud et al., 1997; Brazil et al., 2004b), mas podem produzir resultados diferentes daqueles do hemocítmetro de Neubauer melhorado. As câmaras rasas que se enchem pela ação capilar podem

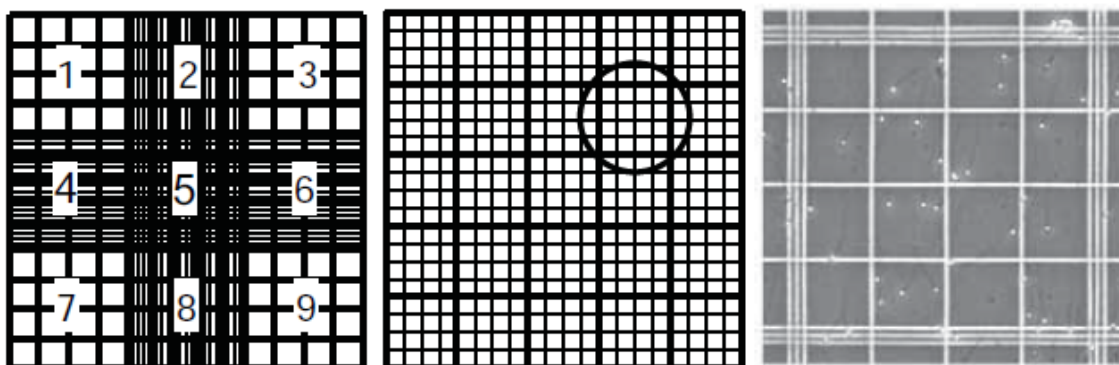
não ter uma distribuição uniforme dos espermatozoides devido ao fluxo contínuo (Douglas-Hamilton et al., 2005a, 2005b). Pode ser corrigido (Douglas-Hamilton et al., 2005a), mas não é recomendado (Björndahl & Barratt, 2005). A validade dessas câmaras de contagem alternativas deve ser estabelecida pela verificação das dimensões da câmara (ver Apêndice 7, seção A7.8), comparando os resultados com o método melhorado do hemocitômetro de Neubauer e obtendo um desempenho satisfatório conforme demonstrado por um programa externo de controle de qualidade. Para uma avaliação precisa das baixas concentrações de espermatozoides, podem ser necessárias câmaras de contagem de grandes volumes (ver Seção 2.11.2).

2.7.2 O hemocitômetro de Neubauer melhorado

O hemocitômetro de Neubauer melhorado possui duas câmaras de contagem separadas, cada uma com um padrão microscópico de 3 mm x 3 mm de linhas de grade gravadas na superfície do vidro. Ele é usado com uma lamela especial espessa (espessura de 4, 0,44 mm), que fica sobre as grades e é apoiada por pilares de vidro 0,1 mm acima do piso da câmara. Cada área de contagem é dividida em nove grades de 1 mm x 1 mm. Essas grades são referidas pelos números mostrados na Fig. 2.7.

Fig. 2.7 O hemocitômetro de Neubauer melhorado

Esboços da área inscrita mostram: todas as nove grades em uma câmara do hemocitômetro (*painel esquerdo*); a grade central (número 5) com 25 grandes quadrados (*painel do meio*); e uma micrografia de parte de uma câmara cheia (*painel da direita*), mostrando um dos 25 quadrados da grade central (o quadrado circulado no painel do meio) delimitado por linhas triplas e contendo 16 quadrados menores.



Micrografia cortesia de C Brazil.

Com uma profundidade de 100 μm , cada grade contém 100 nl. Quatro dessas grades (n^{os} 1, 3, 7 e 9) contêm quatro fileiras de quatro quadrados, cada um segurando 6,25 nl; duas grades (n^{os} 2 e 8) contêm quatro filas de cinco quadrados, cada um com 5 nl; duas grades (n^{os} 4 e 6) contêm cinco filas de quatro quadrados, cada um com 5 nl; e a grade central (número 5) contém cinco linhas de cinco quadrados, cada um de 4 nl (Fig. 2.7, painel do meio). Cada um dos 25 quadrados da grade central (número 5) é subdividido em 16 quadrados menores (Fig. 2.7, painel direito). Assim, as grades 1, 2, 3, 7, 8 e 9 têm quatro linhas cada uma contendo 25 nl por fila, enquanto as grades 4, 5 e 6 têm cinco linhas cada uma contendo 20 nl por fila.

Dependendo da diluição e do número de espermatozoides contados, diferentes áreas da câmara são usadas para determinar a concentração de

espermatozoides. Para as diluições 1 + 19 (1: 20) e 1 + 4 (1: 5), as linhas da grade 5 são avaliadas e, quando necessário, das grades 4 e 6 (ver Seção 2.8). Para diluições 1 + 1 (1: 2), todas as nove grades podem ser avaliadas, se necessário, para obter uma contagem de 200 espermatozoides (ver Seção 2.11.1).

2.7.3 Usando a grade do hemocitômetro

- Contar apenas espermatozoides inteiros (com cabeça e cauda).
- A contagem ou não de um espermatozoide é determinada pela localização de sua cabeça; a orientação de sua cauda não é importante. O limite de um quadrado é indicado pela linha do meio dos três; assim, um espermatozoide é contado se a maior parte de sua cabeça estiver entre as duas linhas internas, mas não se a maior parte de sua cabeça estiver entre as duas linhas externas (Fig. 2.8, painel esquerdo).
- Para evitar a contagem do mesmo espermatozoide em quadrados adjacentes, um espermatozoide com sua cabeça na linha que divide dois quadrados adjacentes deve ser contado apenas se essa linha for uma de duas linhas de contorno perpendiculares. Por exemplo, as células podem ser contadas se a maior parte da cabeça do espermatozoide estiver nos limites centrais inferiores ou esquerdos, que formam uma forma em “L” (ver Fig. 2.8, painel central), mas não se estiver na linha limite central superior ou direita (Fig. 2.8, painel direito).

Nota: Se houver muitas caudas de espermatozoides sem cabeça (cabeças de alfinete) ou cabeças sem cauda, a presença delas deve ser registrada no relatório. Se considerado necessário, a sua concentração pode ser avaliada da mesma forma que para os espermatozoides (ver Seção 2.8), ou a sua prevalência relativa aos espermatozoides pode ser determinada a partir de preparações coradas (ver Seção 2.17.6).

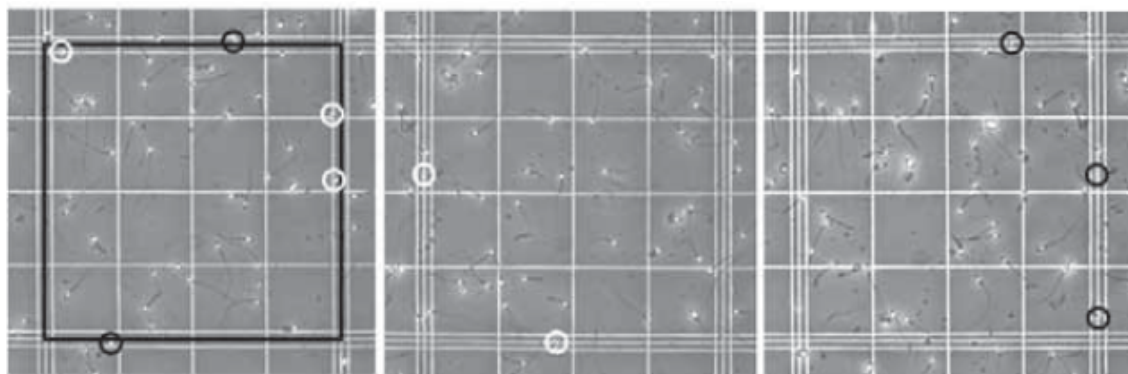
2.7.4 Cuidado da câmara de contagem

As câmaras de contagem dos hemocitômetros devem ser utilizadas com as lamínulas grossas especiais (espessura 4, 0,44 mm).

- Limpar a câmara do hemocitômetro e lamínula com água e secar bem com um pano após o uso, pois qualquer resíduo seco pode inibir o carregamento. Esfregar a superfície da grade removerá quaisquer espermatozoides residuais da amostra anterior.
- Mergulhar as câmaras reutilizáveis e as lamínulas durante a noite em desinfetante (consulte o Apêndice 2, seção A2.4) para evitar a contaminação por agentes potencialmente infecciosos do sêmen.

Fig. 2.8 Quais espermatozoides contar nos quadrados da grade

O meio das três linhas define o limite do quadrado (linha preta, painel esquerdo). Todos os espermatozoides dentro do quadrado central são contados, assim como aqueles com suas cabeças entre as duas linhas internas (círculos brancos), mas não aqueles cujas cabeças se encontram entre as duas linhas externas (círculos pretos). Um espermatozoide com a maior parte de sua cabeça dentro da linha central é contado apenas se essa linha for a linha inferior ou esquerda do quadrado (círculos brancos, painel central), mas não se for a linha superior ou direita do quadrado (círculos pretos, painel direito).



Micrografias cortesia de C Brazil.

2.7.5 Fixador para diluir o sêmen

1. Dissolver 50 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 10 ml de formalina a 35% (v/v) em 1000 ml de água purificada.
2. Se desejar, adicionar 0,25 g de azul de tripano (índice de cor 23859) ou 5 ml de violeta de genciana saturada (> 4 mg/ml) (índice de cor 42555) para realçar as cabeças dos espermatozoides.
3. Armazenar a 4 °C. Se cristais se formarem na solução, passe-a por um filtro de 0,45 μm antes de usar.

2.7.6 A importância de contar suficientes espermatozoides

Para reduzir os erros de amostragem, um número crítico de espermatozoides deve ser contado (de preferência um total de pelo menos 400, a partir de contagens replicadas de aproximadamente 200) (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).

Quadro 2.7 Erros na estimativa de números

A precisão da estimativa do número de espermatozoides depende do número de espermatozoides contados. Em uma distribuição de Poisson, o erro padrão (EP) de uma contagem (N) é sua raiz quadrada (\sqrt{N}) e o intervalo de confiança de 95% (IC) para o número de espermatozoides no volume de sêmen é de aproximadamente $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ (ou $N \pm$ aproximadamente $2 \times \sqrt{N}$).

Se 100 espermatozoides são contados, o EP é 10 ($\sqrt{100}$), e o IC 95% é 80-120 (100 ± 20).

Se 200 espermatozoides são contados, o EP é 14 ($\sqrt{200}$), e o IC 95% é 172-228 (200 ± 28).

Se 400 espermatozoides forem contados, o EP é 20 ($\sqrt{400}$) e o IC 95% é 360-440 (400 ± 40).

Os erros de amostragem podem ser convenientemente expressos como uma porcentagem da contagem ($100 \times (\sqrt{N}/N)$). Estes são mostrados na Tabela 2.2.

Nota: Esses valores são apenas aproximados, pois os intervalos de confiança nem sempre são simétricos em torno da estimativa. Os intervalos exatos de confiança de 95%, com base nas propriedades da distribuição de Poisson, são 361–441 para uma contagem de 400, 81,4–121 para uma contagem de 100, 4,80–18,4 para uma contagem de 10, 0,03–5,57 para uma contagem de 1 e 0,00 a 3,70 para uma contagem de 0.

Tabela 2.2 Erros de amostragem arredondados (%) de acordo com o número total de espermatozoides

Total (N)	Erro de amostragem (%)	Total (N)	Erro de amostragem (%)	Total (N)	Erro de amostragem (%)
1	100	25	20	85	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

Comentário 1: A contagem de poucos espermatozoides produzirá um resultado incerto (consulte o Apêndice 7, seção A7.1), que pode ter consequências para o diagnóstico e a terapia (consulte o Apêndice 7, seção A7.2). Isto pode ser inevitável quando os espermatozoides são tomados para fins terapêuticos e os números de espermatozoides são baixos (ver Seção 5.1).

Comentário 2: Quando o volume de sêmen é pequeno e menos espermatozoides são contados do que o recomendado, a precisão dos valores obtidos será significativamente reduzida. Se menos de 200 espermatozoides forem contados por repetição, relate o erro de amostragem como indicado na Tabela 2.2.

2.8 Procedimento de contagem de rotina

As diluições 1 + 4 (1: 5) e 1 + 19 (1: 20) são apropriadas para uma gama de concentrações espermáticas, produzindo cerca de 200 espermatozoides em um ou em todos os números 4, 5 e 6 do hemocítômetro (ver Tabela 2.3 e Quadro 2.8).

Quadro 2.8 Atingir 200 espermatozoides por réplica nas três grades centrais da câmara melhorada de Neubauer

Se existirem 100 espermatozoides por campo de alta potência (HPF) de 4 nl (ver Quadro 2.9) na preparação úmida inicial, existem teoricamente 25 por nl (25.000 por μ l ou 25.000.000 por ml). Como a grade central (número 5) da câmara de Neubauer melhorada comporta 100 nl, haveria 2500 espermatozoides dentro dela. A diluição da amostra 1 + 4 (1: 5) reduziria o fundo e o número de espermatozoides para cerca de 500 por grade, o que é suficiente para um erro de amostragem aceitavelmente baixo.

Se houver 10 espermatozoides por HPF na preparação úmida, haverá 2,5 por nl e 250 por grade central. Diluir a amostra 1 + 1 (1: 2) como sugerido reduziria o fundo e o número de espermatozoides para cerca de 125 por grade; isso daria 375 nas três grades numeradas de 4, 5 e 6 - novamente, isso é suficiente para um erro de amostragem aceitavelmente baixo.

Nota: Estas concentrações calculadas só podem ser estimativas aproximadas, porque poucos espermatozoides são contados e os volumes podem não ser precisos. As concentrações estimadas das preparações não diluídas podem estar entre 30% e 130% das concentrações derivadas de amostras diluídas em câmaras de contagem.

2.8.1 Determinar a diluição necessária

A diluição do sêmen necessária para permitir que o número de espermatozoides seja medido com precisão é avaliada a partir de uma preparação de sêmen não

diluído. Esta é geralmente a preparação úmida (ver Seção 2.4.2) usada para avaliação da motilidade.

- Examinar uma das preparações úmidas, feita conforme descrito na Seção 2.4.2, para estimar o número de espermatozoides por HPF ($\times 200$ ou $\times 400$).
- Um HPF é equivalente a aproximadamente 16 nl (a $200\times$) ou 4 nl (a $400\times$) (ver Quadro 2.9).
- Se os espermatozoides forem observados, contá-los, determinar a diluição necessária na Tabela 2.3 e proceder como na Seção 2.8.2.
- Se nenhum espermatozoide for observado, examinar a preparação úmida replicada. Se nenhum espermatozoide for encontrado na segunda preparação, proceder como descrito na Seção 2.9.

Quadro 2.9 Volume observado por campo de alta potência de uma preparação úmida com 20 μm de profundidade

O volume de sêmen observado em cada campo microscópico depende da área do campo (πr^2 , onde π é aproximadamente 3,142 e r é o raio do campo microscópico) e da profundidade da câmara (20,7 μm para a preparação úmida). O diâmetro do campo microscópico pode ser medido com um micrômetro ou pode ser estimado dividindo o diâmetro da abertura da lente ocular pela ampliação da lente objetiva.

Com uma objetiva de $40\times$ e uma ocular de $10\times$ de abertura de 20 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 500 μm (20 mm/40). Neste caso, $r = 250\text{ }\mu\text{m}$, $r^2 = 62\text{ }500\text{ }\mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196\text{ }375\text{ }\mu\text{m}^2$ e o volume é $4\text{ }064\text{ }962\text{ }\mu\text{m}^3$ ou cerca de 4 nl.

Com uma objetiva de $20\times$ e uma ocular de $10\times$ de abertura de 20 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 1000 μm (20 mm/20). Neste caso, $r = 500\text{ }\mu\text{m}$, $r^2 = 250\text{ }000\text{ }\mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 785\text{ }500\text{ }\mu\text{m}^2$ e o volume é $16\text{ }259\text{ }850\text{ }\mu\text{m}^3$ ou cerca de 16 nl.

Tabela 2.3 Diluições de sêmen necessárias, como fazê-las, quais câmaras usar e áreas potenciais para avaliar

Espermatozoides por campo $\times 400$	Espermatozoides por campo $\times 200$	Diluição necessária	Sêmen (μl)	Fixador (μl)	Câmara	Área a ser avaliada
>101	>404	1: 20 (1 + 19)	50	950	Neubauer melhorada	Grades 5, 4, 6
16–100	64–400	1: 5 (1 + 4)	50	200	Neubauer melhorada	Grades 5, 4, 6
2–15	8–60	1: 2 (1 + 1)	50	50	Neubauer melhorada	Grades 5, 4, 6
<2	<8	1: 2 (1 + 1)	50	50	Neubauer melhorada ou grande volume	Todas as 9 grades ou Toda a lâmina

Nota 1: As pipetas de células brancas do sangue e as pipetas automáticas que dependem do deslocamento de ar não são precisas o suficiente para fazer diluições volumétricas de sêmen viscoso; use pipetas de deslocamento positivo.

Nota 2: Para fins de diagnóstico, amostras de sêmen para análise não devem ter menos de 50 μl de volume, para evitar erros de pipetagem associados a pequenos volumes.

Nota 3: Se houver muito poucos espermatozoides por campo de visão na diluição recomendada,

prepare outra diluição mais baixa. Se houver muitos espermatozoides sobrepostos por campo de visão na diluição recomendada, prepare outra diluição mais alta.

Nota 4: Se uma diluição 1 + 19 (1: 20) for inadequada, use 1 + 49 (1: 50).

Comentário 1: Se o número de espermatozoides na preparação úmida inicial for baixo (<4 por \times 400 HPF: aproximadamente $1 \times 10^6/\text{ml}$), um número exato de espermatozoides pode não ser necessário (ver Seção 2.10).

Comentário 2: Para uma avaliação precisa das baixas concentrações de espermatozoides (<2 por \times 400 HPF: <aproximadamente $0,5 \times 10^6/\text{ml}$), recomenda-se usar todas as nove grades da câmara de Neubauer melhorada (ver Seção 2.11.1) ou uma câmara descartável de volume grande com detecção de fluorescência (ver Seção 2.11.2).

2.8.2 Preparar as diluições e carregar as câmaras do hemocitômetro

- Umedecer ligeiramente a superfície do hemocitômetro respirando nele.
- Fixar a lamela sobre as câmaras de contagem, pressionando-a firmemente sobre os pilares da câmara. A iridescência (múltiplos anéis de Newton) entre as duas superfícies de vidro confirma o posicionamento correto da lamínula. Quanto mais linhas houver, melhor será o ajuste; apenas uma ou duas linhas podem indicar problemas com variação na profundidade da câmara.
- Usar uma pipeta de deslocamento positivo para dispensar a quantidade apropriada de fixador (ver Tabela 2.3) em dois frascos de diluição.
- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Aspirar o volume apropriado de sêmen imediatamente após a mistura, não permitindo tempo para que os espermatozoides fiquem fora da suspensão (ver Tabela 2.3).
- Limpar o sêmen do lado de fora da ponta da pipeta, tomando cuidado para não tocar na abertura da ponta.
- Dispensar o sêmen no fixador e enxaguar a ponta da pipeta, aspirando e expressando o fixador.
- Misturar novamente a amostra de sêmen e preparar a diluição replicada seguindo as etapas acima.
- Misturar bem a primeira diluição, por meio de vórtex, durante 10 segundos à velocidade máxima. Remover imediatamente aproximadamente 10 μl de suspensão fixa, para evitar o assentamento dos espermatozoides.
- Tocar a ponta da pipeta cuidadosamente contra a borda inferior de uma das câmaras na ranhura em forma de V.
- Pressionar o êmbolo da pipeta lentamente, permitindo que a câmara se encha por ação capilar. A lamínula não deve ser movida durante o enchimento e a câmara não deve ser enchida em excesso (quando a lamela possa ser vista para se mover) ou insuficientemente preenchida (quando ar ocupe parte da área da câmara).
- Misturar a segunda diluição, como acima, e remover imediatamente uma segunda alíquota de 10 μl . Carregar a segunda câmara do hemocitômetro seguindo as etapas acima.
- Armazenar o hemocitômetro horizontalmente durante pelo menos 4 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento. As células imobilizadas sedimentarão durante a maior parte desse tempo.

Nota 1: Algumas câmaras são construídas com pilares de vidro fosco; nestes, os anéis de Newton não aparecerão. Aplicar cerca de 1,5 μl de água em cada pilar de vidro fosco para manter a lamínula no lugar (Brazil et al., 2004a), tomando cuidado para não introduzir água na

área de contagem.

Nota 2: O uso de braçadeiras no hemocítmetro para manter a lamela no lugar garantirá uma profundidade constante (Christensen et al., 2005).

Nota 3: Em amostras muito viscosas, o sêmen pode se agregar dentro do fluido de diluição se a mistura demorar 5 a 10 segundos. Nestes casos, a amostra diluída pode passar por vórtex por 10 segundos imediatamente após a adição do sêmen ao fixador.

2.8.3 Avaliação do número de espermatozoides nas câmaras de contagem

O número de espermatozoides deve ser avaliado em ambas as câmaras do hemocítmetro. Se os dois valores estiverem de acordo, as alíquotas tomadas podem ser consideradas representativas da amostra (ver Seção 2.4.1).

- Examinar o hemocítmetro com óptica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
- Contar pelo menos 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de alcançar um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).
- Avaliar primeiro a grade central (número 5 na Fig. 2.7) de um lado da câmara melhorada de Neubauer, linha a linha.
- Continuar contando até que pelo menos 200 espermatozoides tenham sido observados e uma linha completa (de cinco quadrados grandes) tenha sido examinada. A contagem deve ser feita por linhas completas; não pare no meio de uma linha. Se 200 espermatozoides não forem observados nas cinco linhas da grade central, continue a contagem nas linhas (de 4 grandes quadrados) das duas grades adjacentes (n^{os} 4 e 6 na Fig. 2.7).
- Anotar o número de linhas avaliadas para alcançar pelo menos 200 espermatozoides. O mesmo número de linhas será contado na outra câmara do hemocítmetro.
- Registrar o número de espermatozoides e linhas com auxílio de um contador de laboratório.
- Mudar para a segunda câmara do hemocítmetro e realizar a contagem replicada com o mesmo número de linhas (o mesmo volume) que a primeira réplica, mesmo que isto dê menos de 200 espermatozoides.
- Calcular a soma e a diferença dos dois números.
- Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.4 ou da Figura A7.1, Apêndice 7. (Cada um mostra a diferença máxima entre as contagens que se espera que ocorram em 95% das amostras por causa do erro de amostragem isolado).
- Se a diferença for aceitável, calcular a concentração (veja a Seção 2.8.4). Se a diferença for muito alta, preparar duas novas diluições conforme descrito na Seção 2.8.2 e repetir as contagens replicadas (ver Quadro 2.10).
- Relatar a concentração média de espermatozoides em dois algarismos significativos.
- Calcular o número total de espermatozoides por ejaculado (ver Seção 2.8.7).

Nota 1: Se menos de 200 espermatozoides forem encontrados nas grades 4, 5 e 6, não continue a contar nas grades 1, 2, 3, 7, 8 ou 9, pois o volume de cada linha nessas grades difere do das linhas nas grades 4, 5 e 6 (ver Seção 2.7.2). Neste caso, prepare e avalie duas diluições menores. Se uma diluição 1 + 1 (1: 2) for necessária, proceda como na Seção 2.11.

Nota 2: Avaliar a mesma câmara duas vezes ou avaliar ambas as câmaras preenchidas a partir de uma única diluição não é uma replicação verdadeira, pois isso não permitiria a detecção de erros de amostragem, mistura e diluição.

Tabela 2.4 Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas para uma determinada soma

Soma	Diferença Aceitável*	Soma	Diferença Aceitável*
144–156	24	329–346	36
157–169	25	347–366	37
170–182	26	367–385	38
183–196	27	386–406	39
197–211	28	407–426	40
212–226	29	427–448	41
227–242	30	449–470	42
243–258	31	471–492	43
259–274	32	493–515	44
275–292	33	516–538	45
293–309	34	539–562	46
310–328	35	563–587	47

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

Quadro 2.10 Comparação de contagens replicadas

Espera-se que a diferença entre as contagens independentes seja zero, com um erro padrão igual à raiz quadrada da soma das duas contagens. Assim $(N1-N2)/(\sqrt{(N1+N2)})$ deve ser $<1,96$ apenas por acaso para um limite de confiança de 95%.

Se a diferença entre as contagens for menor ou igual à indicada nas Tabelas 2.4 ou 2.5 para a soma dada, as estimativas são aceitas e a concentração é calculada a partir de sua média.

Diferenças maiores sugerem que ocorreram erros de contagem ou houve erros de pipetagem, ou as células não foram bem misturadas, resultando em distribuição não aleatória na câmara ou na lâmina.

Quando a diferença entre as contagens for maior do que a aceitável, descarte os dois primeiros valores e prepare e avalie duas novas diluições de sêmen. (Não conte uma terceira amostra e tome a média dos três valores ou tome a média dos dois valores mais próximos).

Isto se aplica à contagem de espermatozoides e de células positivas para peroxidase (ver Seção 2.18). Para células positivas para CD45 (ver Seção 3.2) e células germinais imaturas (ver Seção 2.19), as preparações coradas devem ser reavaliadas.

Com esses valores de corte de IC de 95%, aproximadamente 5% dos replicados estarão fora dos limites apenas por acaso.

Nota: Em raras ocasiões, com amostras não homogêneas, até mesmo um terceiro conjunto de réplicas pode fornecer diferenças inaceitáveis. Nesse caso, calcule a média de todas as réplicas e observe isso no relatório.

2.8.4 Cálculo da concentração de espermatozoides no sêmen

Recomenda-se calcular e relatar a concentração de espermatozoides no sêmen. Embora a concentração não seja uma medida específica da função testicular, ela está relacionada às taxas de fertilização e gravidez.

A concentração de espermatozoides no sêmen é o seu número (N) dividido pelo volume em que foram encontrados, ou seja, o volume do número total (n) de linhas examinadas para as réplicas (20 nl cada para as grades 4, 5 e 6), multiplicado pelo fator de diluição. Ou seja, $C = (N/n) \times (1/20) \times \text{fator de diluição}$.

Para diluições de 1 + 4 (1: 5), utilizando as grelhas 4, 5 e 6, a concentração $C = (N/n) \times (1/20) \times 5$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times (1/4)$ espermatozoides/nl (ou 10^6 por ml de sêmen).

Para diluições de 1 + 19 (1: 20), utilizando as grelhas 4, 5 e 6, a concentração $C = (N/n) \times (1/20) \times 20$ espermatozoides por nl = (N/n) espermatozoides/nl (ou 10^6 por ml de sêmen).

Para diluições de 1 + 49 (1: 50), utilizando as grelhas 4, 5 e 6, a concentração $C = (N/n) \times (1/20) \times 50$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times 2,5$ espermatozoides/nl (ou 10^6 por ml de sêmen).

2.8.5 Exemplos práticos

Exemplo 1. Com uma diluição de 1 + 19 (1: 20), o replicado 1 contém 201 espermatozoides em sete filas, enquanto o replicado 2 contém 245 espermatozoides em sete filas. A soma dos valores (201 + 245) é 446 em 14 linhas e a diferença (245-201) é 44. A partir da Tabela 2.4, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (41), portanto novas diluições replicadas são feitas.

Exemplo 2. Com uma diluição 1 + 19 (1: 20), o replicado 1 contém 220 espermatozoides em quatro filas, enquanto o replicado 2 contém 218 espermatozoides em quatro filas. A soma dos valores (220 + 218) é 438 em oito linhas e a diferença (220-218) é 2. Na Tabela 2.4, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (41), portanto os valores são aceitos.

A concentração das amostras para uma diluição de 1 + 19 (1: 20) é $C = (N/n) \times 1,0$ espermatozoides por nl, ou seja $(438/8) \times 1,0 = 54,75$ espermatozoides/nl, ou 55×10^6 espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos).

Nota: Para diluições de 1 + 19 (1: 20) e as grades 4, 5 e 6, a concentração é fácil de calcular. O número total de espermatozoides contados dividido pelo número total de linhas avaliadas é igual à concentração espermática em $10^6/\text{ml}$. No exemplo acima, o cálculo é $(220 + 218)/(4 + 4) = 438/8 = 55 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen.

Exemplo 3. Com uma diluição de 1 + 19 (1: 20), o replicado 1 contém 98 espermatozoides em 15 filas (grades 5, 4 e 6), enquanto o replicado 2 contém 114 espermatozoides em 15 filas (grades 5, 4 e 6). A soma dos valores (98 + 114) é 212 em 30 linhas e a diferença (114-98) é 16. Na Tabela 2.4, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (29), portanto os valores são aceitos.

A concentração da amostra para uma diluição de 1 + 19 (1: 20) é $C = (N/n) \times 1,0$ espermatozoides por nl ou $(212/30) \times 1,0 = 7,07$ espermatozoides/nl, ou $7,1 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen (para dois números significativos). Como menos de 400 espermatozoides foram contados, relatar o erro de amostragem para 212 espermatozoides dados na Tabela 2.2 (aproximadamente 7%).

Nota: Neste exemplo, a amostra foi superdiluída, uma vez que menos de 200 espermatozoides foram encontrados nas grades 5, 4 e 6; uma diluição de 1 + 4 (1: 5) teria sido mais apropriada.

Exemplo 4. Com uma diluição 1 + 4 (1: 5), o replicado 1 contém 224 espermatozoides em quatro filas, enquanto o replicado 2 contém 268 espermatozoides em quatro filas. A soma dos valores (224 + 268) é 492 em oito linhas e a diferença (268-224) é 44. A partir da Tabela 2.4, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (43), portanto novas diluições replicadas são feitas.

Exemplo 5. Com uma diluição 1 + 4 (1: 5), o replicado 1 contém 224 espermatozoides em oito filas, enquanto o replicado 2 contém 213 espermatozoides em oito filas. A soma dos valores (224 + 213) é 437 em 16 linhas e a diferença (224-213) é 11. Na Tabela 2.4, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (41), portanto os valores são aceitos.

A concentração da amostra para uma diluição de 1 + 4 (1: 5) é $C = (N/n) \times (1/4)$ espermatozoides por nl ou $(437/16)/4 = 6,825$ espermatozoides/nl, ou $6,8 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos).

Nota: Para diluições de 1 + 4 (1: 5), a concentração também é simples de calcular, mas o número total de espermatozoides contados dividido pelo número total de linhas avaliadas é dividido por 4. No exemplo acima, o cálculo é $((224 + 213)/(8 + 8))/4 = (437/16)/4 = 27,3/4 = 6,8 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen.

2.8.6 Limite inferior de referência para a concentração de espermatozoides

O limite inferior de referência para a concentração de espermatozoides é de 15×10^6 espermatozoides por ml (5º percentil, IC 95% $12-16 \times 10^6$).

2.8.7 Cálculo do número total de espermatozoides no ejaculado

Recomenda-se calcular e relatar o número total de espermatozoides por ejaculado, pois esse parâmetro fornece uma medida da capacidade dos testículos em produzir espermatozoides e da patência do trato masculino. É obtido pela multiplicação da concentração de espermatozoides pelo volume de todo o ejaculado.

2.8.8 Limite inferior de referência para o número total de espermatozoides

O limite inferior de referência para o número total de espermatozoides é de 39×10^6 espermatozoides por ejaculado (5º percentil, IC 95% $33-46 \times 10^6$).

2.9 Números espermáticos baixos: criptozoospermia e suspeita de azoospermia

Se nenhum espermatozoide for observado nas preparações úmidas replicadas, pode-se suspeitar de azoospermia. Embora tenha sido sugerido que a definição

deveria mudar (Sharif, 2000; Ezech & Moore, 2001), a azoospermia continua sendo uma descrição do ejaculado, e não uma afirmação de sua origem ou uma base para diagnóstico e terapia. É geralmente aceito que o termo azoospermia só pode ser usado se nenhum espermatozoide for encontrado no sedimento de uma amostra centrifugada (Eliasson, 1981).

No entanto, deve-se ter em mente que:

- Se os espermatozoides são ou não encontrados no sedimento depende do tempo e velocidade de centrifugação (Lindsay et al., 1995; Jaffe et al., 1998) e de quanto o sedimento é examinado;
- A centrifugação a 3000g durante 15 minutos não sedimenta todos os espermatozoides de uma amostra (Corea et al., 2005); e
- Após a centrifugação, a motilidade pode se perder (Mortimer, 1994a) e a concentração será subestimada (Cooper et al., 2006).

A maneira como essas amostras são tratadas depende se os dados subjetivos sobre a presença e a motilidade dos espermatozoides são suficientes (ver Seção 2.10) ou são necessários números precisos de espermatozoides (ver Seção 2.11).

2.10 Quando uma avaliação obrigatória de um baixo número de espermatozoides não é necessária

Se o número de espermatozoides por HPF na preparação molhada inicial for baixo (0 a 4 por $\times 400$ HPF ou 0 a 16 por $\times 200$ HPF), várias opções estão disponíveis.

2.10.1 Não realizar nenhuma ação

Se o número de espermatozoides por $\times 400$ HPF for <4 (ou seja, $<\text{aproximadamente } 1 \times 10^6/\text{ml}$), é suficiente, para a maioria dos fins clínicos, reportar a concentração de espermatozoides como $<2 \times 10^6/\text{ml}$ (para ter em conta o alto erro de amostragem associado com baixos números de espermatozoides), inserindo uma observação se espermatozoides móveis foram vistos ou não.

2.10.2 Exame de amostras centrifugadas para detectar espermatozoides

Quando não se observam espermatozoides na preparação úmida, a amostra pode ser centrifugada para determinar se existem espermatozoides em uma amostra maior.

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3). Se a amostra for viscosa, reduzir a viscosidade conforme descrito na Seção 2.3.1.1.
- Remover uma alíquota de 1 ml de sêmen e centrifugar a 3000g durante 15 minutos.
- Decantar a maior parte do sobrenadante e ressuspender o sedimento de esperma nos restantes 50 μl (aproximadamente) de plasma seminal.
- Colocar uma alíquota de 10 μl do sedimento em cada uma das duas lâminas sob lamelas de 22 mm \times 22 mm. Isso criará duas preparações úmidas com aproximadamente 20 μm de profundidade (ver Quadro 2.4).
- Examinar as lâminas com ótica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 250$.
- Revisar a lamela inteira sistematicamente campo por campo. Começar em um canto e percorrer ao longo do eixo x para o lado oposto; em seguida, mover um

campo ao longo do eixo y e fazer a varredura ao longo de toda a largura. Continuar neste ziguezague para fazer uma busca completa e sistemática de toda a alíquota (veja a Fig. 2.9). Continuar observando a lâmina enquanto muda de campo.

- Com uma lente objetiva de $\times 20$ e uma lente ocular $10\times$ com abertura de 20 mm, o campo do microscópio terá um diâmetro de aproximadamente 1000 μm (ver Quadro 2.9). Haverá assim aproximadamente 484 campos (22×22) por cada 22 mm x 22 mm de lamela a ser examinada.
- A presença de espermatozoides em qualquer dos dois replicados indica criptozoospermia.
- A ausência de espermatozoides de ambos os replicados sugerem azoospermia.

Nota 1: Muitas centrífugas de mesa que usam tubos de 15 ml não atingirão os 3000g: use uma centrífuga de alta velocidade que use tubos de 1,5 a 2,0 ml. Certifique-se de que a amostra de sêmen esteja bem misturada antes de tirar a alíquota.

Nota 2: A varredura das lâminas pode levar até 10 minutos, já que a amostra terá um fundo alto.

Nota 3: Ao centrifugar amostras para reprodução assistida, toda a amostra de sêmen e a maior parte do sedimento (por exemplo, quatro alíquotas de 10 μl de sedimento) podem precisar ser analisadas para encontrar espermatozoides vivos.

Comentário 1: A ausência de espermatozoides móveis na alíquota examinada não significa necessariamente que estejam ausentes do resto da amostra.

Comentário 2: Como a centrifugação não sedimenta todos os espermatozoides, este método não pode ser usado para determinar o número total de espermatozoides. Para quantificação, consulte Seções 2.11.1 ou 2.11.2.

2.10.3 Exame de amostras não centrifugadas para detectar espermatozoides móveis

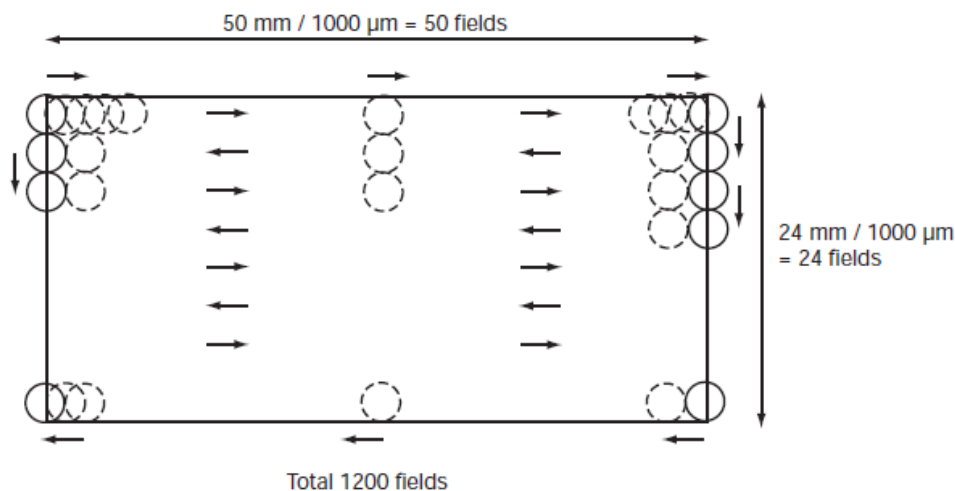
Quando espermatozoides móveis são procurados (por exemplo, em uma amostra de sêmen pós-vasectomia), a diluição da amostra em centrifugação fixadora ou de alta velocidade deve ser evitada. Neste caso, apenas uma alíquota da amostra não diluída pode ser avaliada.

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Remover uma alíquota de 40 μl de sêmen e colocar sob uma lamínula de 24 mm x 50 mm. Isso criará uma preparação úmida com 33 μm de profundidade (ver Quadro 2.4).
- Examinar a lâmina com ótica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 250$.
- Revisar a lamela inteira sistematicamente campo por campo. Começar em um canto e percorrer ao longo do eixo x para o lado oposto; em seguida, mover um campo ao longo do eixo y e fazer a varredura ao longo de toda a largura. Continuar neste ziguezague para fazer uma busca completa e sistemática de toda a alíquota (veja a Fig. 2.9). Continuar observando a lâmina enquanto muda de campo.
- Com uma lente objetiva de $\times 20$ e uma lente ocular $10\times$ com abertura de 20 mm, o campo do microscópio terá um diâmetro de aproximadamente 1000 μm (ver Quadro 2.9). Haverá assim aproximadamente 1200 campos (24×50) por cada 24 mm x 50 mm de lamela a ser examinada.

Nota: Este procedimento pode levar até 10 minutos, já que a amostra terá um fundo alto.

Fig. 2.9 Exame de toda a lamínula para procura de espermatozoides móveis

Envolve a avaliação de aproximadamente 1200 campos de alta potência com aumento de 200x para uma lamela de 24 mm x 50 mm e aproximadamente 484 campos de alta potência com ampliação de 200x para uma lamela de 22 mm x 22 mm.



50 mm / 1000 µm = 50 fields	50 mm / 1000 µm = 50 campos
24 mm / 1000 µm = 24 fields	24 mm / 1000 µm = 24 campos
Total 1200 fields	Total 1200 campos

Comentário: A ausência de espermatozoides móveis na alíquota examinada não significa necessariamente que estejam ausentes do resto da amostra.

2.11 Quando uma avaliação precisa de um baixo número de espermatozoides é necessária

Esta seção descreve métodos para determinar baixas concentrações de espermatozoides que evitam a centrifugação. A alternativa à sedimentação dos espermatozoides é usar uma baixa diluição de sêmen e examinar volumes maiores.

Uma precisão de 20% é considerada aceitável quando se lida com limites inferiores de quantificação (LLQ) (Shah et al., 2000). Examinar toda a grade central (número 5 na Fig. 2.7) da câmara de Neubauer melhorada, quando preenchido com sêmen diluído 1 + 1 (1: 2), pode teoricamente detectar uma concentração de 250.000 espermatozoides por ml com um erro de amostragem de 20%. Quando todas as nove grades são examinadas, uma concentração de espermatozoides tão baixa quanto 27.800 por ml pode ser estimada. Câmaras descartáveis de grande volume contendo 25 µl podem ser usadas para medir uma concentração de 1000 espermatozoides por ml com o mesmo erro de amostragem (Cooper et al., 2006). Para o sêmen diluído 1 + 1 (1: 2), como recomendado aqui, estes valores correspondem a concentrações de espermatozoides no sêmen não diluído de 500.000 por ml, 55.600 por ml e 2.000 por ml, respectivamente. No entanto, as amostras de sêmen diluídas tão pouco podem apresentar uma grande quantidade de fundo. A varredura de grandes câmaras pode levar de 10 a 20 minutos, mas a detecção rápida de espermatozoides pode ser facilitada pelo uso de um corante fluorescente (ver Seção 2.11.2).

2.11.1 Avaliação do baixo número de espermatozoides em toda a câmara melhorada de Neubauer (microscopia de fase com contraste)

Para reduzir os erros de amostragem, um número crítico de espermatozoides deve ser contado (de preferência um total de pelo menos 400, a partir de contagens replicadas de aproximadamente 200) (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Remover uma alíquota de sêmen e diluir 1 + 1 (1: 2) com fixador (consulte a Seção 2.7.5), tomando as precauções especificadas na Seção 2.8.2.
- A diluição 1 + 1 (1: 2) para amostras com menos de dois espermatozoides por HPF na preparação úmida inicial (Tabela 2.3) é apropriada para uma gama de concentrações de espermatozoides, produzindo cerca de 200 espermatozoides no hemocítômetro (ver Quadro 2.11). Entre uma e nove grades terão de ser avaliadas.

Quadro 2.11 Atingir 200 espermatozoides por réplica em todas as nove grades centrais da câmara melhorada de Neubauer

Se existirem 2 espermatozoides por HPF de 4 nl na preparação úmida inicial, existem teoricamente 0,5 espermatozoides por nl (500 espermatozoides por μ l ou 500.000 espermatozoides por ml).

Como todas as 9 grades da câmara de Neubauer melhorada juntas contêm 900 nl, haveria 450 espermatozoides nelas. Diluir a amostra 1 + 1 (1: 2), como sugerido, reduziria o fundo e o número de espermatozoides para 225 por câmara, o suficiente para um erro de amostragem aceitavelmente baixo.

Nota: Este valor só pode ser uma estimativa aproximada, porque poucos espermatozoides são contados e os volumes podem estar imprecisos.

2.11.1.1 Procedimento

1. Diluir duas alíquotas da amostra de sêmen 1 + 1 (1: 2) com fixador, como acima explicado.
2. Encher cada câmara do hemocítômetro com as diluições replicadas, uma réplica por câmara.
3. Armazenar o hemocítômetro horizontalmente durante pelo menos 4 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento. As células imobilizadas sedimentarão durante a maior parte desse tempo.
4. Examinar o hemocítômetro com óptica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
5. Contar pelo menos 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de alcançar um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).
6. Examinar uma câmara, grade por grade, e continuar contando até que pelo menos 200 espermatozoides tenham sido observados e uma grade completa tenha sido examinada. A contagem deve ser feita por grades completas; não pare no meio de uma grade.
7. Anotar o número de grades avaliadas para alcançar pelo menos 200 espermatozoides. O mesmo número de grades será contado na outra câmara do hemocítômetro.
8. Registrar o número de espermatozoides e grades com auxílio de um contador de laboratório.
9. Mudar para a segunda câmara do hemocítômetro e realizar a contagem replicada com o mesmo número de grades (o mesmo volume) que a primeira réplica, mesmo que isto dê menos de 200 espermatozoides.
10. Calcular a soma e a diferença dos dois números.
11. Determinar a aceitabilidade da diferença na Tabela 2.5 (que estende a Tabela 2.4 para diminuir os números de espermatozoides) ou a Fig. A7.1, Apêndice 7. (Cada um mostra a diferença máxima entre as duas contagens que se espera

que ocorram em 95% das amostras por causa do erro de amostragem isolado).

12. Se a diferença for aceitável, calcular a concentração (veja a Seção 2.11.1.2). Se a diferença for muito alta, fazer duas novas preparações conforme descrito acima e repetir as contagens replicadas (ver Quadro 2.10).
13. Relatar a concentração média de espermatozoides em dois algarismos significativos.
14. Calcular o número total de espermatozoides por ejaculado (ver Seção 2.11.1.5).

Tabela 2.5 Diferenças aceitáveis entre duas contagens para uma soma dada: baixas concentrações

Soma	Diferença Aceitável*	Soma	Diferença Aceitável*	Soma	Diferença Aceitável*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

2.11.1.2 Cálculo de baixas concentrações de espermatozoides no sêmen

A concentração de espermatozoides no sêmen é o seu número (N) dividido pelo volume em que foram encontrados, ou seja, o volume do número total (n) de grades examinadas para as réplicas (onde o volume de uma grade é de 100 nl), multiplicado pelo fator de diluição. Ou seja, $C = (N/n) \times (1/100) \times \text{fator de diluição}$.

Para uma diluição de 1 + 1 (1: 2), a concentração $C = (N/n) \times (1/100) \times 2$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times (1/50)$ espermatozoides/nl.

Quando todas as nove grades são avaliadas em cada câmara do hemocítmetro, o número total de espermatozoides é dividido pelo volume total de ambas as câmaras (1,8 µl) e multiplicado pelo fator de diluição (2), para obter a concentração em espermatozoides por µl (milhares por ml de sêmen).

2.11.1.3 Sensibilidade do método

Se houver menos de 200 espermatozoides em cada câmara, o erro de amostragem excederá 5%. Quando são encontrados menos de 400 espermatozoides em ambas as câmaras, relatar o erro de amostragem para o número de células contadas (ver Tabela 2.2).

Se menos de 25 espermatozoides forem contados em cada câmara, a concentração será <56.000 espermatozoides por ml; este é o limite inferior de quantificação para um erro de amostragem de 20% quando todas as nove grades da câmara de Neubauer melhorada são avaliadas em uma diluição 1 + 1 (1: 2) (Cooper et al., 2006). Relate o número de espermatozoides observados com o comentário “Poucos espermatozoides contados para uma determinação precisa da concentração (<56.000/ml)”.

Comentário: A ausência de espermatozoides na alíquota examinada não significa necessariamente que estejam ausentes do resto da amostra.

2.11.1.4 Exemplos práticos

Exemplo 1. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), verificou-se que a réplica 1 contém 200 espermatozoides em duas grades, enquanto a réplica 2 contém 250 espermatozoides nas duas grades. A soma dos valores (200 + 250) é 450 em quatro grades e a diferença (250-200) é 50. A partir da Tabela 2.5, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (42), então os resultados serão descartados e duas novas diluições replicadas serão feitas.

Exemplo 2. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), verificou-se que a réplica 1 contém 210 espermatozoides em três grades, enquanto a réplica 2 contém 200 espermatozoides nas três grades. A soma dos valores (210 + 200) é 410 em seis grades e a diferença (210-200) é 10. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (40), portanto os valores são aceitos.

A concentração de espermatozoides na amostra para uma diluição de 1 + 1 (1: 2) é $C = (N/n) \times (1/50)$ espermatozoides por nl ou $(410/6)/50 = 1,37$ espermatozoides/nl, ou $1,4 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos).

Exemplo 3. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), verificou-se que a réplica 1 contém 120 espermatozoides em todas as nove grades, enquanto a réplica 2 contém 140 espermatozoides nas nove grades. A soma dos valores (120 + 140) é 260 em 18 grades e a diferença (140-120) é 20. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (32), portanto os valores são aceitos.

Quando todas as nove grades são avaliadas em cada câmara (um total de 1,8 µl), a concentração de espermatozoides na amostra para uma diluição de 1 + 1 (1: 2) é $C = (N/1,8) \times 2$ espermatozoides por µl = $(260/1,8) \times 2 = 288,8$ espermatozoides/µl, ou 290×10^3 espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos). Como menos de 400 espermatozoides foram contados, relatar o erro de amostragem para 260 espermatozoides dados na Tabela 2.2 (aproximadamente 6%).

Exemplo 4. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), verificou-se que a réplica 1 continha 10 espermatozoides em todas as nove grades, enquanto a réplica 2 continha 8 espermatozoides nas nove grades. Como menos de 25 espermatozoides foram contados, a concentração é <56.000/ml; relate que “18 espermatozoides foram vistos nos replicados, muito poucos para uma determinação precisa da concentração (<56.000/ml)”.

Exemplo 5. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), não se encontram espermatozoides em nenhuma das réplicas. Como menos de 25 espermatozoides foram contados, a concentração é <56.000/ml; relate que “Nenhum espermatozoide foi visto nos replicados, muito poucos para uma determinação precisa da concentração (<56.000/ml)”.

2.11.1.5 Cálculo do número total de espermatozoides no ejaculado

Recomenda-se calcular e relatar o número total de espermatozoides por ejaculado, pois esse parâmetro fornece uma medida da capacidade dos testículos em produzir espermatozoides e da patência do trato masculino. É obtido pela multiplicação da concentração de espermatozoides pelo volume de todo o ejaculado.

2.11.2 Avaliação do baixo número de espermatozoides em lâminas descartáveis de grande volume (microscopia de fluorescência)

O uso de câmaras de grande volume e 100 µm de profundidade pode aumentar a sensibilidade da avaliação da concentração (Cooper et al., 2006). A lâmina de grande volume tem duas câmaras de 100 µm de profundidade, cada uma contendo 25 µl. Para reduzir os erros de amostragem, um número crítico de espermatozoides deve ser contado (de preferência um total de pelo menos 400, a partir de contagens replicadas de aproximadamente 200) (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Remover uma alíquota de sêmen e diluir 1 + 1 (1: 2) com fixador (ver Seção 2.7.5) contendo fluorocromo de bisbenzimidazol Hoechst 33342 (1 mg/l), tomando as precauções indicadas na Seção 2.8.2.

A diluição 1 + 1 (1: 2) para amostras com menos de 2 espermatozoides na avaliação inicial (Tabela 2.3) é apropriada para uma gama de concentrações espermáticas, rendendo cerca de 200 espermatozoides em toda a câmara (ver Quadro 2.12).

Quadro 2.12 Atingir 200 espermatozoides por réplica em uma câmara descartável de grande volume com 100 µm de profundidade

Se houver apenas 1 espermatozoide por HPF de 4 nl na preparação úmida inicial, há teoricamente 0,25 espermatozoides por nl (250 por µl ou 250.000 por ml). A câmara de grande volume contém 25 µl, de modo que haveria 6.250 espermatozoides dentro dela. Diluir a amostra 1 + 1 (1: 2), como sugerido, reduziria o fundo e o número de espermatozoides para 3125 por câmara, o suficiente para um erro de amostragem aceitavelmente baixo.

Nota: Este valor só pode ser uma estimativa aproximada, porque poucos espermatozoides são contados e os volumes podem estar imprecisos.

2.11.2.1 Procedimento

1. Diluir duas alíquotas da amostra de sêmen 1 + 1 (1: 2) com fixador, como acima explicado.
2. Encher cada câmara da lâmina com 25 µl de diluições replicadas, uma réplica por câmara.

3. Armazenar a lâmina horizontalmente durante 10–15 minutos no escuro à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento. O corante irá ligar-se às cabeças dos espermatozoides e as células imobilizadas irão se assentar no chão da câmara durante este tempo.
4. Examinar a lâmina com óptica de fluorescência usando um espelho dicróico relevante e um filtro de barreira com ampliação de $\times 250$.
5. Contar pelo menos 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de alcançar um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).
6. Examinar uma câmara, sistematicamente, campo por campo. Começar em um canto e percorrer ao longo do eixo x para o lado oposto; em seguida, mover um campo ao longo do eixo y e fazer a varredura ao longo de toda a largura. Continuar neste ziguezague (veja Fig. 2.9). Continuar observando a lâmina enquanto muda de campo. Continuar contando até que pelo menos 200 espermatozoides tenham sido observados.
7. Anotar o número de campos avaliados para alcançar pelo menos 200 espermatozoides. O mesmo número de campos será contado na outra câmara.
8. Registrar o número de espermatozoides e campos com auxílio de um contador de laboratório.
9. Mudar para a segunda câmara e realizar a contagem replicada com o mesmo número de campos (o mesmo volume) que a primeira réplica, mesmo que isto dê menos de 200 espermatozoides.
10. Calcular a soma e a diferença dos dois números.
11. Determinar a aceitabilidade da diferença na Tabela 2.5 (que estende a Tabela 2.4 para diminuir os números de espermatozoides) ou a Fig. A7.1, Apêndice 7. (Cada um mostra a diferença máxima entre as duas contagens que se espera que ocorram em 95% das amostras por causa do erro de amostragem isolado).
12. Se a diferença for aceitável, calcular a concentração (veja a Seção 2.11.2.2). Se a diferença for muito alta, fazer duas novas preparações e repetir a avaliação (ver Quadro 2.10).
13. Relatar a concentração média de espermatozoides em dois Algarismos significativos.
14. Calcular o número total de espermatozoides por ejaculado (ver Seção 2.11.2.5).

Nota 1: Os espermatozoides aparecem como pontos fluorescentes brilhantes (núcleos condensados) ao contrário de leucócitos e células não espermáticas, que têm uma fluorescência mais difusa (indicando seus núcleos maiores) (Zinaman et al., 1996).

Nota 2: Se estiver incerto sobre a fonte de um sinal fluorescente, mude para a óptica de contraste de fase em que a cauda do esperma pode ser vista.

2.11.2.2 Cálculo de baixas concentrações de espermatozoides no sêmen

A concentração de espermatozoides no sêmen é o seu número (N) dividido pelo volume do número total (n) de campos microscópicos examinados (onde o volume (v) de um campo é calculado como no Quadro 2.13), multiplicado pela diluição. Ou seja, $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{fator de diluição}$.

Com uma ampliação de $\times 250$, o volume do campo é de 80 nl (ver Quadro 2.13) e para uma diluição 1 + 1 (1: 2), a concentração é $C = (N/n) \times (1/80) \times 2$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times (1/40)$ espermatozoides/nl (10^6 espermatozoides por ml de sêmen).

Com uma ampliação de $\times 400$, o volume do campo é de 20 nl (ver Quadro 2.13) e para uma diluição 1 + 1 (1: 2), a concentração é $C = (N/n) \times (1/20) \times 2$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times (1/10)$ espermatozoides/nl (10^6 espermatozoides por ml de sêmen).

Quando toda a área de ambas as câmaras for avaliada, o número total de espermatozoides será dividido pelo volume total de ambas as câmaras (50 μl) e multiplicado pelo fator de diluição (2), para obter a concentração em espermatozoides/ μl (milhares por ml de sêmen).

Quadro 2.13 Volume observado por campo de alta potência em uma câmara descartável de grande volume com 100 μm de profundidade

O volume de sêmen em cada campo microscópico depende da área do campo (πr^2 , onde π é aproximadamente 3,142 e r é o raio do campo microscópico) e da profundidade da câmara (aqui 100 μm).

O diâmetro do campo microscópico pode ser medido com um micrômetro ou pode ser estimado dividindo o diâmetro da abertura da lente ocular pela ampliação da lente objetiva.

Com uma objetiva de 40 \times e uma ocular de 10 \times de abertura de 20 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 500 μm (20 mm/40). Neste caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e o volume é $19.637.500 \mu\text{m}^3$ ou cerca de 20 nl.

Com uma objetiva de 25 \times e uma ocular de 10 \times de abertura de 25 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 1000 μm (25 mm/25). Neste caso, $r = 500 \mu\text{m}$, $r^2 = 250.000 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 785.500 \mu\text{m}^2$ e o volume é $78.550.000 \mu\text{m}^3$ ou cerca de 80 nl.

2.11.2.3 Sensibilidade do método

Se houver menos de 200 espermatozoides em cada câmara, o erro de amostragem excederá 5%. Quando menos de 400 espermatozoides são encontrados em ambas as réplicas, relatar o erro de amostragem para o número de células contadas (ver Tabela 2.2).

Se menos de 25 espermatozoides forem contados em cada câmara, a concentração será <2000 espermatozoides/ml (este é o limite inferior de quantificação para um erro de amostragem de 20% quando a câmara inteira (25 μl) é avaliada e é utilizada uma diluição 1 + 1 (1: 2)) (Cooper et al., 2006). Relate o número de espermatozoides observados com o comentário “Poucos espermatozoides contados para uma determinação precisa da concentração ($<2000/\text{ml}$)”.

Comentário: A ausência de espermatozoides na alíquota examinada não significa necessariamente que estejam ausentes do resto da amostra.

2.11.2.4 Exemplos práticos

Exemplo 1. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), o replicado 1 contém 210 espermatozoides em 300 campos, enquanto o replicado 2 contém 300 espermatozoides em 300 campos. A soma dos valores (210 + 300) é 510 em 600 campos e a diferença (300-210) é 90. A partir da Tabela 2.5, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (44), então os resultados serão descartados e duas novas diluições replicadas serão feitas.

Exemplo 2. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), o replicado 1 contém 200 espermatozoides em 400 campos, enquanto o replicado 2 contém 230 espermatozoides em 400 campos. A soma dos valores (200 + 230) é 430 em 800 campos e a diferença (230-200) é 30. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (41), portanto os valores são aceitos.

A concentração de espermatozoides na amostra, para uma diluição 1 + 1 (1: 2) de espermatozoides é $C = (N/n) \times (2/v)$ por nl. Se $v = 20$ nl (aumento de 400 ×, ver Quadro 2.13), $C = (430/800) \times (2/20) = 0,0538$ espermatozoides/nl ou 54.000 espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos).

Exemplo 3. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), a réplica 1 contém 50 espermatozoides em toda a câmara, enquanto a réplica 2 contém 70 espermatozoides em toda a câmara. A soma dos valores (50 + 70) é 120 nas duas câmaras e a diferença (70-50) é 20. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (21), portanto os valores são aceitos.

Quando toda a área de ambas as câmaras for avaliada (um total de 50 µl), a concentração da amostra, para uma diluição de 1 + 1 (1: 2), é $C = (N/50) \times 2$ espermatozoides por µl = $(120/50) \times 2 = 4,8$ espermatozoides/µl, ou 4800 espermatozoides por ml de sêmen (para dois algarismos significativos). Como menos de 400 espermatozoides foram contados, relatar o erro de amostragem para 120 espermatozoides dados na Tabela 2.2 (aproximadamente 10%).

Exemplo 4. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), a réplica 1 contém 20 espermatozoides em toda a câmara, enquanto a réplica 2 contém 18 espermatozoides em toda a câmara. Como menos de 25 espermatozoides foram contados, a concentração será <2000 espermatozoides/ml. Relate que “38 espermatozoides foram vistos nas réplicas, muito poucos para uma determinação precisa da concentração (<2000/ml)”.

Exemplo 5. Com uma diluição 1 + 1 (1: 2), não se encontram espermatozoides em nenhuma das réplicas. Como menos de 25 espermatozoides foram contados, a concentração será <2000 espermatozoides/ml. Relate que “Nenhum espermatozoide foi visto nas réplicas, muito poucos para uma determinação precisa da concentração (<2000/ml)”.

2.11.2.5 Cálculo dos números totais de espermatozoides no ejaculado

Recomenda-se calcular e relatar o número total de espermatozoides por ejaculado, pois esse parâmetro fornece uma medida da capacidade dos testículos em produzir espermatozoides e da patência do trato masculino. É obtido pela multiplicação da concentração de espermatozoides pelo volume de todo o ejaculado.

2.12 Contagem de células não espermáticas

A presença de células não espermáticas no sêmen pode ser indicativa de dano testicular (células germinativas imaturas), patologia dos ductos eferentes (tufos ciliares) ou inflamação das glândulas acessórias (leucócitos). O número de células não espermáticas no sêmen (células epiteliais, “células redondas” (células germinativas e leucócitos) ou cabeças e caudas espermáticas isoladas) pode ser estimado em preparações úmidas fixas com uso de um hemocitômetro da mesma maneira que para espermatozoides (ver Seção 2.8.3). No entanto, o sêmen que tenha sido diluído adequadamente para a contagem de espermatozoides normalmente será muito diluído para uma estimativa precisa de células não espermáticas, a menos que altas concentrações estejam presentes. A prevalência de células redondas em relação aos espermatozoides pode ser avaliada nas lâminas (ver Seção 2.12.1). Alternativamente, sua concentração pode ser avaliada durante a estimativa de células positivas para peroxidase (ver Seção 2.18.1.5).

2.12.1 Cálculo da concentração de células redondas no sêmen

Calcula-se a concentração de células arredondadas em relação à dos espermatozoides avaliando esfregaços de sêmen fixos e corados não diluído (ver Seção 2.13.2). Se N é o número de células arredondadas contadas no mesmo número de campos que 400 espermatozoides e S é a concentração de espermatozoides (10^6 por ml), então a concentração (C) de células redondas (10^6 por ml) pode ser calculada a partir da fórmula $C = S \times (N/400)$.

2.12.2 Sensibilidade do método

Se houver menos células redondas do que espermatozoides na amostra (ou seja, <400), o erro de amostragem excederá 5%. Nesse caso, relate o erro de amostragem para o número de células contadas (consulte a Tabela 2.2). Se menos de 25 células redondas forem contadas, informe o número de células redondas observadas com o comentário “Muito poucas para uma determinação precisa da concentração”.

2.12.3 Exemplos práticos

Exemplo 1. Na réplica 1 existem 21 células redondas por 200 espermatozoides, enquanto na réplica 2 existem 39 células redondas por 200 espermatozoides. A soma dos valores (21 + 39) é 60 e a diferença (39-21) é 18. A partir da Tabela 2.5, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (15), então os resultados serão descartados e duas novas avaliações serão feitas.

Exemplo 2. Na réplica 1 existem 24 células redondas por 200 espermatozoides, enquanto na réplica 2 existem 36 células redondas por 200 espermatozoides. A soma dos valores (24 + 36) é 60 e a diferença (36-24) é 12. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (15), portanto os valores são aceitos.

60 células redondas por 400 espermatozoides e uma concentração de espermatozoides de 70×10^6 células por ml, a concentração de células redondas é $C = S \times (N/400)$ células por ml = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ células por ml, ou 10×10^6 células por ml (a dois algarismos significativos). Como menos de 400

células foram contadas, relatar o erro de amostragem para 60 células indicadas na Tabela 2.2 (aproximadamente 13%).

Comentário 1: Se a estimativa da concentração de células redondas exceder 1×10^6 por ml, a sua natureza deve ser avaliada pela atividade da peroxidase (ver Seção 2.18) ou marcadores leucocitários (ver Seção 3.2) e sua concentração medida com precisão. Pode ser possível identificar células germinais imaturas em preparações bem coradas (ver Seção 2.19).

Comentário 2: O número total de células redondas no ejaculado pode refletir a gravidade da condição inflamatória ou espermatogênica. É obtido pela multiplicação da concentração de células redondas pelo volume de todo o ejaculado.

2.13 Morfologia espermática

A determinação da morfologia espermática compreende os seguintes passos (que são descritos em detalhes nas seções subsequentes).

- Preparar o esfregaço de sêmen em uma lâmina (ver Seção 2.13.2).
- Secar ao ar, fixar e corar a lâmina (ver Seção 2.14).
- Montar a lâmina com uma lamínula, se a lâmina for mantida por um longo período de tempo (ver Seções 2.14.2.4 e 2.14.2.5).
- Examinar a lâmina com óptica de campo claro na ampliação $\times 1000$ com imersão em óleo (ver Seções 2.15 e 2.16).
- Avaliar cerca de 200 espermatozoides por repetição para uma percentagem de formas normais (ver Seção 2.15.1) ou de formas normais e anormais (ver Seção 2.15.2).
- Comparar os valores da réplica para ver se eles estão razoavelmente próximos: em caso afirmativo, prosseguir com os cálculos; se não, reler as lâminas.

2.13.1 O conceito de espermatozoides normais

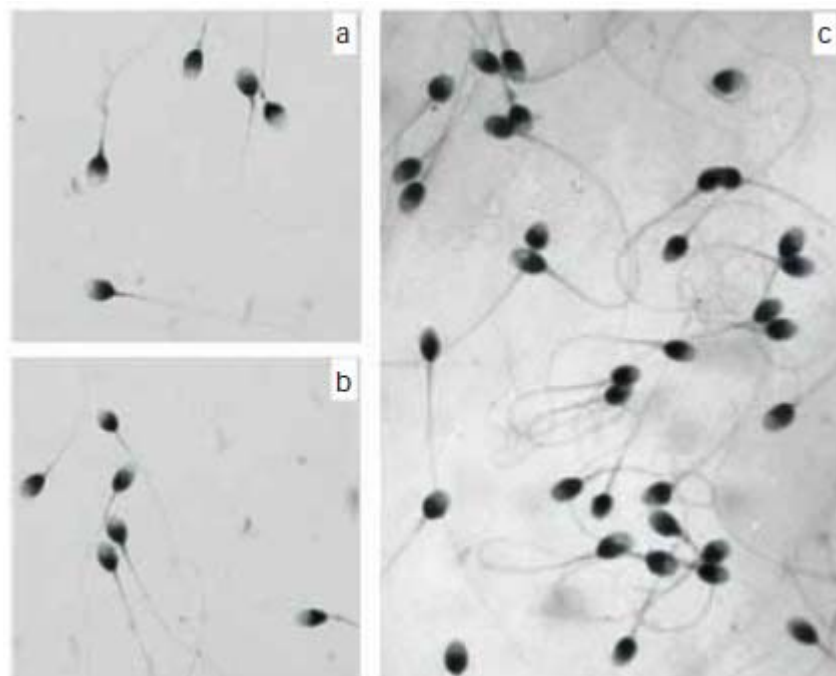
A morfologia variável dos espermatozoides humanos dificulta a sua avaliação, mas as observações sobre os espermatozoides recuperados do trato reprodutivo feminino, especialmente no muco endocervical pós-coito (Fredricsson & Björk, 1977; Menkveld et al., 1990) e também da superfície da zona pelúcida (Menkveld et al., 1991; Liu & Baker, 1992a) (ver Fig. 2.10), ajudaram a definir a aparência dos espermatozoides potencialmente fertilizantes (morfologicamente normais). Pela aplicação estrita de certos critérios de morfologia espermática, foram estabelecidas as relações entre a percentagem de formas normais e vários desfechos de fertilidade (tempo até a gravidez (TTP), taxas de gravidez in vivo e in vitro) (Eggert-Kruse et al., 1996; Jouannet et al., 1988; Toner et al., 1995; Coetzee et al., 1998; Menkveld et al., 2001; Van Waart et al., 2001; Garrett et al., 2003; Liu et al., 2003), que podem ser úteis para o prognóstico de fertilidade.

A filosofia subjacente do sistema de classificação aqui descrito é limitar o que é identificado como normal à subpopulação potencialmente fertilizante dos espermatozoides prevalentes no muco endocervical. Usando essas diretrizes, o intervalo de valores normais percentuais para homens férteis e inférteis é provável que seja de 0 a 30%, com poucas amostras excedendo 25% de espermatozoides normais (Menkveld et al., 2001). Esse valor baixo inevitavelmente produzirá baixos limiares; de fato, limites de referência e limiares de 3 a 5% das formas normais foram encontrados em estudos de fertilização in vitro (Coetzee et al., 1998), inseminação intrauterina (Van Waart et al., 2001) e fertilidade in vivo (Van der Merwe et al., 2005).

A zona pelúcida humana também seleciona uma subpopulação de espermatozoides morfologicamente similares, mas esses espermatozoides “preferidos da zona” exibem uma gama mais ampla de formas (Liu et al., 1990; Garrett et al., 1997). A porcentagem de espermatozoides móveis no sêmen de pais exibindo morfologia “preferidos da zona” também é baixa (8–25%) (Liu et al., 2003).

Fig. 2.10 Espermatozoides morfologicamente “normais”

(a, b) Espermatozoides corados com Shorr recuperados da zona pelúcida in vitro. (c) Espermatozoides corados com Papanicolau recuperados do muco endocervical após a relação sexual. Muitos poucos defeitos são observados na cabeça, peça intermediária ou peça principal dos espermatozoides. As caudas podem ser curvas, mas não anguladas.



(a, b) Reproduzido de Liu et al. (2003) com permissão da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia. (c) Reproduzido de Menkveld & Kruger (1990) com permissão.

2.13.2 Preparação de esfregaços de sêmen

A rápida adição de fixador ao sêmen não permite a visualização adequada dos espermatozoides, pois eles são obscurecidos por proteínas seminais desnaturadas. Para análise morfológica, é costume preparar esfregaços de sêmen secados ao ar antes da fixação e coloração. No entanto, esse processo leva a artefatos morfológicos, uma vez que a secagem do sêmen está associada a:

- Alterações nas dimensões dos espermatozoides: os espermatozoides secos, fixos e corados são menores que os espermatozoides vivos visualizados no sêmen (Katz et al., 1986);
- Expansão das cabeças dos espermatozoides imaturos (Soler et al., 2000); e

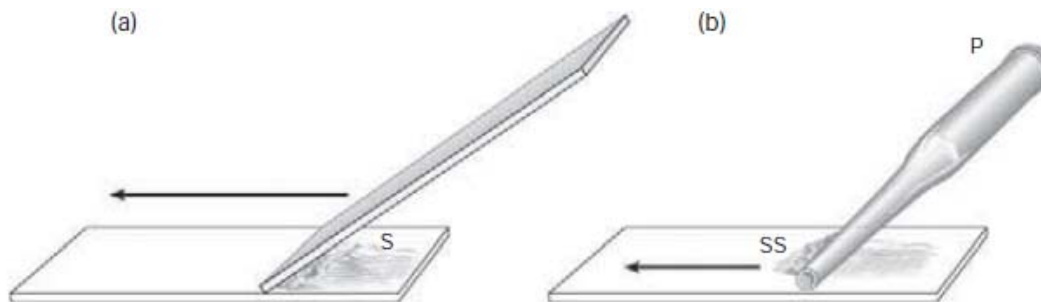
- Perda de gotículas citoplasmáticas osmoticamente sensíveis (Abraham-Pesqueira et al., 2002; Cooper et al., 2004), embora grandes quantidades de excesso de citoplasma residual sejam retidas.

Dois ou mais esfregaços devem ser feitos a partir da amostra de sêmen fresco no caso de haver problemas com a coloração ou quando uma lâmina estiver quebrada. A avaliação é realizada duas vezes, preferencialmente em cada uma das duas lâminas, porque pode haver uma variação significativa na morfologia espermática entre as lâminas.

- Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
- Remover uma alíquota imediatamente, não permitindo que os espermatozoides fiquem fora de suspensão.
- Misturar novamente a amostra de sêmen antes de remover as alíquotas replicadas.
- Diferentes métodos de esfregaço podem ser usados em diferentes condições (Fig. 2.11).

Fig. 2.11 Métodos de esfregaço de sêmen para morfologia espermática

(a) Método de “plumagem” (feathering) para sêmen não diluído. A gota de sêmen (S) se espalha ao longo da borda traseira da lâmina inclinada e é puxada para frente sobre a lâmina para formar o esfregaço. (b) Método de pipeta para amostras lavadas. Uma gota da suspensão de espermatozoides (SS) é espalhada sobre a superfície da lâmina, empurrando a pipeta horizontalmente (P).



2.13.2.1 Amostras de sêmen normal

Neste procedimento, uma alíquota de sêmen é espalhada sobre toda a superfície da lâmina pela técnica de plumagem (Figs. 2.11a, 2.12).

1. Limpar ambas as superfícies das lâminas foscas esfregando vigorosamente com papel absorvente que não solte fiapos.
2. Etiquetar a parte fosca com informações de identificação (por exemplo, número de identificação, data) usando um lápis com mina médio-dura (HB ou Nº 2).
3. Aplicar uma alíquota de 5-10 µl de sêmen, dependendo da concentração espermática, até o final da lâmina. Usar uma segunda lâmina para puxar a gota de sêmen ao longo da superfície da lâmina (Figs. 2.11a, 2.12). Se a lâmina que puxa a gota não for fosca, as bordas de ambas as extremidades da lâmina podem ser usadas para fazer quatro esfregaços diferentes.

4. Deixar as lâminas secarem ao ar e fazer a coloração conforme descrito na Seção 2.14.

Nota 1: Os lápis são estáveis em fixadores e colorações, enquanto tinta e alguns marcadores permanentes não são.

Nota 2: Não deixe a gota de sêmen permanecer no final da lâmina por mais de alguns segundos antes de fazer o esfregaço.

Nota 3: Certifique-se de colocar a lâmina à frente da gota para “puxar” o sêmen pela lâmina; não use a lâmina para “empurrar” o sêmen desde atrás.

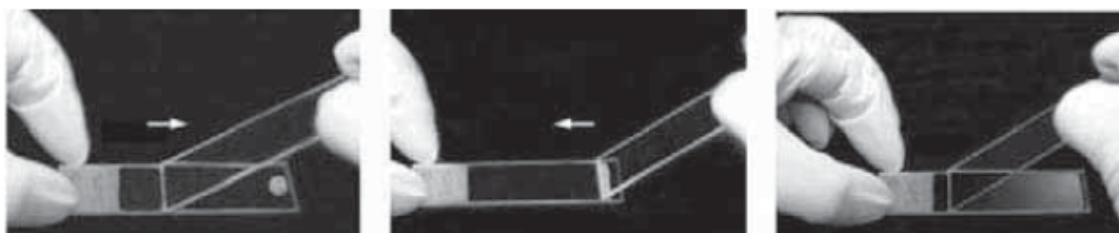
A qualidade do esfregaço (mínima sobreposição de espermatozoides na lâmina) depende de:

- O volume de sêmen e a concentração de espermatozoides: quanto menos espermatozoides, menor a probabilidade de se sobreporem;
- O ângulo da lâmina que puxa (Hotchkiss 1945): quanto menor o ângulo, mais fino o esfregaço;
- A velocidade de esfregaço (Eliasson 1971): quanto mais rápido o movimento, mais espessa a mancha.

Comece com um volume de 10 μ , um ângulo de 45 ° e um esfregado de aproximadamente 1 segundo. Estes parâmetros podem então ser variados, se necessário, para reduzir a sobreposição de espermatozoides na lâmina (Menkveld et al., 1990). A técnica funciona bem quando a viscosidade do sêmen é baixa, mas muitas vezes é inadequada para o sêmen extremamente viscoso (veja Fig. 2.12 e Seção 2.13.2.3).

Fig. 2.12 Preparando um esfregaço de sêmen normal

Para obter a sensação do movimento, coloque a lâmina de arrasto em um ângulo de 45 ° e coloque-a em contato com a alíquota do sêmen (painel esquerdo), que corre ao longo da borda da lâmina (painel do meio). Traga a lâmina lentamente para trás (durante aproximadamente 1 segundo) ao longo do comprimento da lâmina para produzir o esfregaço (painel direito).



Fotografias cortesia de C Brazil.

Com baixas concentrações de espermatozoides ($<2 \times 10^6/\text{ml}$), amostras viscosas ou carregadas de detritos, ou quando a morfologia assistida por computador deve ser feita (ver Seção 3.5.4), abordagens diferentes podem ser necessárias.

2.13.2.2 Amostras com baixa concentração de espermatozoides

Se a concentração de espermatozoides for baixa (por exemplo, $<2 \times 10^6/\text{ml}$), concentre a amostra:

1. Centrifugar a amostra a 600g por 10 minutos.
2. Remover a maior parte do sobrenadante.
3. Ressuspender o sedimento no restante do sobrenadante por meio de pipetagem suave.
4. Obter a maior concentração de espermatozoides possível, não excedendo aproximadamente $50 \times 10^6/\text{ml}$.
5. Trate-a como uma amostra normal (ver Seção 2.13.2.1).

Nota: A centrifugação pode afetar a morfologia espermática e seu uso deve ser registrado.

2.13.2.3 Amostras de sêmen viscoso

Às vezes é difícil preparar bons esfregaços porque o plasma seminal é altamente viscoso, resultando em manchas de espessura irregular. As amostras viscosas podem ser tratadas da mesma maneira que as amostras mal liquefeitas (ver Seção 2.3.1.1) ou por lavagem (ver Seção 2.13.2.4).

Nota: Estes procedimentos podem afetar a morfologia espermática e seu uso deve ser registrado.

2.13.2.4 Lavagem de amostras de sêmen carregadas de detritos ou viscosas e redução do fundo para avaliação morfométrica espermática auxiliada por computador.

Os detritos e uma grande quantidade de material particulado (como em amostras viscosas) podem fazer com que os espermatozoides jazam com a cabeça na borda, dificultando a categorização. Estas amostras podem ser lavadas, como segue.

1. Diluir uma alíquota de sêmen (0,2 a 0,5 ml, dependendo da concentração de espermatozoides) em 10 ml de solução salina normal (0,9 g de cloreto de sódio (NaCl) por 100 ml de água purificada) à temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 800g por 10 minutos.
3. Decantar a maior parte do sobrenadante.
4. Ressuspender o sedimento no sobrenadante restante (tipicamente 20-40 μl) por meio de pipetagem suave.
5. Fazer um esfregaço da suspensão espalhando 5-10 μl de suspensão de espermatozoides em uma lâmina de microscópio com uma pipeta Pasteur (ver Fig. 2.11b).
6. Examinar a lâmina com ótica de contraste de fase na ampliação de $\times 400$ para garantir que o esfregaço esteja espalhado uniformemente.
7. Verificar se existem pelo menos 40 espermatozoides por campo $\times 400$ sem aglomeração ou sobreposição.

8. Deixar as lâminas secarem ao ar e fazer a coloração conforme descrito na Seção 2.14.

Nota 1: Se muitos espermatozoides estiverem sobrepostos na lâmina, faça outro esfregaço usando uma alíquota menor de sêmen.

Nota 2: Se os espermatozoides estiverem escassos demais na lâmina, faça outro esfregaço com uma alíquota maior de sêmen.

Nota 3: Lavar a amostra pode afetar a morfologia espermática e o procedimento deve ser registrado.

Comentário: Deixar o sêmen para se liquefazer por mais de 30 minutos antes de fazer os esfregaços pode reduzir a coloração de fundo.

2.14 Métodos de coloração

Uma vez que os esfregaços de sêmen tenham sido secos ao ar, eles devem ser fixados e corados para destacar os detalhes dos espermatozoides. Recomenda-se a utilização das colorações de Papanicolaou, Shorr ou Diff-Quik.

Com todas as três colorações em óptica de campo claro, a cabeça fica corada de azul pálido na região acrossomal e azul escuro na região pós-acrossomal. A peça intermediária pode mostrar alguma coloração vermelha e a cauda de azul ou avermelhada. O excesso de citoplasma residual, geralmente localizado atrás da cabeça e ao redor da peça intermediária, fica corada de rosa ou vermelho (coloração de Papanicolaou) ou laranja-avermelhado (coloração de Shorr).

Comentário: Métodos de coloração rápida, nos quais uma gota de sêmen é adicionada ao fixador e o corante que estão previamente na lâmina, estão comercialmente disponíveis. Estes não são recomendados, no entanto, porque sem a distribuição uniforme dos espermatozoides fornecida pela técnica para fazer o esfregaço, não é possível observar os detalhes necessários para a classificação morfológica descrita aqui.

2.14.1 Fixação tradicional e coloração sequencial

Envolve as seguintes etapas:

- Etanol para fixar as células; também as desidrata;
- Etanol graduado para reidratar gradualmente os esfregaços fixos, o que permite colorir a hematoxilina solúvel na água;
- Água purificada para reidratar esfregaços secos, o que permite colorir a hematoxilina solúvel na água;
- Hematoxilina para colorir o núcleo de azul;
- Água da torneira para remover a hematoxilina nuclear não ligada;
- Etanol Ácido para remover corante não especificamente ligado do citoplasma (descoloração);
- Água da torneira para reduzir a acidez e retornar a cor azul ao núcleo;
- Solução de Scott para retornar a cor azul ao núcleo (se a água da torneira for insuficiente);
- Etanol para desidratar esfregaços o que permite colorir com Orange G / EA-50 solúvel em etanol;
- Orange G para corar o citoplasma de rosa;
- EA-50 para corar o citoplasma de rosa;

- Etanol graduado para desidratar os esfregaços corados gradualmente o que permite o uso de montantes solúveis em etanol;
- Xileno permite o uso de substâncias indutivas insolúveis em etanol (ver Quadro 2.14).

Quadro 2.14 Meios de montagem

As lâminas podem ser visualizadas desmontadas ou montadas (sem ou com uma lamela anexada). A montagem das lâminas permite o armazenamento a longo prazo, para que possam ser reavaliados, se necessário, e usados em um programa interno de controle de qualidade. O índice de refração (RI) dos elementos de montagem após a secagem (1,50 a 1,55) é semelhante ao do vidro (1,50 a 1,58), e a melhor qualidade óptica é obtida com o uso de óleo de imersão com um RI similar (1,52).

2.14.2 Procedimento de coloração de Papanicolaou para morfologia espermática

A coloração de Papanicolaou dá uma boa coloração aos espermatozoides e outras células. Ela cora as regiões acrossomal e pós-acrossomal da cabeça, o excesso de citoplasma residual, a peça intermediária e a peça principal. A técnica de coloração modificada descrita aqui provou ser útil na análise da morfologia espermática e no exame de células germinativas imaturas e células não-espermáticas (ver Figuras 1–14). Os procedimentos de rotina foram modificados para funcionar sem éter (como fixador) ou xileno (para montagem) (ESHRE/NAFA, 2002) (ver Seção 2.14.2.4). As lâminas coradas usando o procedimento Papanicolaou podem ser permanentemente montadas e armazenadas para uso futuro em programas internos de controle de qualidade. Se armazenadas no escuro, elas devem ficar estáveis por meses ou anos.

O método a seguir foi usado para preparar as placas neste manual, a partir de lâminas que foram montadas em um composto de montagem insolúvel em etanol.

2.14.2.1 Reagentes

1. Colorantes constituintes do Papanicolaou: disponíveis comercialmente ou ver Apêndice 4, seção A4.10.
2. Etanol ácido: adicionar 1,0 ml de ácido clorídrico concentrado a 200 ml de etanol a 70% (v/v).
3. Xileno: etanol, 1 + 1 (1: 2): misturar partes iguais de etanol 100% e xileno.

Nota 1: O xileno é um perigo para a saúde e deve ser usado em uma capela de exaustão.

Nota 2: Os esfregaços devem ser secos ao ar por pelo menos 4 horas, mas podem ser armazenados por até 1 semana, antes da imersão e da coloração.

2.14.2.2 Fixação do esfregaço de sêmen seco

1. Mergulhar as lâminas em etanol a 95% (v/v) por pelo menos 15 minutos.

2.14.2.3 Coloração do esfregaço de sêmen fixado

Submergir sequencialmente as lâminas em:

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 1. Etanol 80% (v/v) | 30 segundos |
| 2. Etanol 50% (v/v) | 30 segundos |
| 3. Água Purificada | 30 segundos |
| 4. Hematoxilina de Harris | 4 minutos |
| 5. Água Purificada | 30 segundos |
| 6. Etanol Ácido | 4-8 mergulhos* |
| 7. Água de torneira | 5 minutos |
| 8. Etanol 50% (v/v) | 30 segundos |
| 9. Etanol 80% (v/v) | 30 segundos |
| 10. Etanol 95% (v/v) | pelo menos 15 minutos |
| 11. Corante G-6 Orange | 1 minuto |
| 12. Etanol 95% (v/v) | 30 segundos |
| 13. Etanol 95% (v/v) | 30 segundos |
| 14. Etanol 95% (v/v) | 30 segundos |
| 15. Corante EA-50 Green | 1 minuto |
| 16. Etanol 95% (v/v) | 30 segundos |
| 17. Etanol 95% (v/v) | 30 segundos |
| 18. Etanol 100% | 15 segundos |
| 19. Etanol 100% | 15 segundos |

* Um mergulho corresponde a uma imersão de cerca de 1 segundo.

Nota 1: A fixação com etanol causa a desidratação das células. Portanto, os esfregaços tirados diretamente da etapa de fixação em etanol a 95% para coloração podem precisar de apenas 10 segundos em etanol a 80%, enquanto os esfregões que foram secos ao ar após a fixação devem permanecer por mais tempo (2 a 3 minutos) em etanol a 50%.

Nota 2: Na etapa 6 acima, comece com 4 mergulhos e continue até que os resultados sejam satisfatórios. Este é um passo crítico, pois a duração da descoloração altera dramaticamente a intensidade final da coloração. Se esta etapa for omitida, os espermatozoides e o fundo ficarão escuros. Aumentar o número de mergulhos fará com que os espermatozoides e o fundo fiquem fracos.

Nota 3: As lâminas podem ser visualizadas montadas ou desmontadas.

2.14.2.4 Tratando o esfregaço de sêmen corado antes de montar

Existem dois tipos de fluidos para montar a preparação: solutos solúveis em etanol e insolúveis em etanol.

- Usar meios de montagem solúveis em etanol diretamente em colorações ainda úmidas com etanol.
- Para meios de montagem insolúveis em etanol, retirar as lâminas diretamente da etapa 19, através das etapas a seguir (a serem executadas em uma capela de exaustão):

1. Xileno: etanol, 1 + 1 (1: 2) 1 minuto
2. Xileno 100% 1 minuto

Retirar uma lâmina a cada vez do recipiente de coloração de xileno e deixar escorrer por apenas 1 a 2 segundos, pois a lâmina deve estar bem molhada com xileno durante a montagem.

2.14.2.5 Montando os esfregaços de sêmen corado

1. Adicionar duas ou três pequenas gotas de meio de montagem às lâminas.
2. Colocar uma lamela (24 mm × 50 mm ou 24 mm × 60 mm são mais convenientes) diretamente no esfregaço.
3. Posicionar a lamela de modo que o contato com o meio de montagem comece de um lado longo, a fim de evitar que bolhas de ar fiquem presas.
4. Se necessário, pressionar suavemente a parte superior da lamínula para ajudar a mover as bolhas para a borda da lâmina.
5. Limpar o excesso de xileno (se usado) de baixo da lâmina.
6. Deixar o esfregaço montado secar horizontalmente em um escorredor de lâminas ou em papel absorvente por 24 horas em uma capela de exaustão.

2.14.3 Procedimento de coloração Shorr para morfologia espermática

A coloração Shorr fornece porcentagens semelhantes à coloração de Papanicolaou de formas normais (Meschede et al., 1993).

2.14.3.1 Reagentes

1. Hematoxilina de Harris: Papanicolaou N° 1.
2. Solução Shorr: compre-a pronta para usar ou prepare-a da seguinte maneira. Dissolver 4 g de pó de Shorr em 220 ml de etanol a 50% (v/v) quente. Deixar esfriar, adicionar 2,0 ml de ácido acético glacial (em uma capela de exaustão) e filtrar.
3. Etanol acético: adicionar 25 ml de ácido acético glacial a 75 ml de etanol a 95% (v/v).
4. Etanol amoniacal: adicionar 5 ml de hidróxido de amônio a 25% (v/v) a 95 ml de etanol a 75% (v/v).

2.14.3.2 Fixação do esfregaço de sêmen seco

Mergulhar as lâminas em etanol acético ou etanol a 75% (v/v) por 1 hora.

2.14.3.3 Coloração do esfregaço de sêmen fixado

Submergir sequencialmente as lâminas em:

1. Água corrente da torneira 12–15 mergulhos*
2. Hematoxilina 1–2 minutos
3. Água corrente da torneira 12–15 mergulhos*
4. Etanol amoniacal 10 mergulhos*
5. Água corrente da torneira 12–15 mergulhos*
6. Etanol 50% (v/v) 5 minutos
7. Coloração Shorr 3–5 minutos
8. Etanol 50% (v/v) 5 minutos
9. Etanol 75% (v/v) 5 minutos
10. Etanol 95% (v/v) 5 minutos

* Um mergulho corresponde a uma imersão de cerca de 1 segundo.

Nota: As lâminas podem ser visualizadas montadas ou desmontadas.

2.14.3.4 Montando o esfregaço de sêmen corado

Ver Seções 2.14.2.4 e 2.14.2.5.

2.14.4 Procedimento de coloração rápida para morfologia espermática

Os métodos de coloração rápida são particularmente úteis para laboratórios clínicos que precisam fornecer resultados no dia da análise. Vários conjuntos de coloração diferencial estão disponíveis (Kruger et al., 1987). Alguns esfregaços corados por procedimentos rápidos têm alta coloração de fundo e podem ser de qualidade inferior aos corados com a coloração de Papanicolaou.

2.14.4.1 Reagentes

1. Kit de coloração rápida Diff-Quik, composto por:
 - a) reagente fixador (corante triarilmetano dissolvido em metanol);
 - b) solução de coloração 1 (xanteno eosinofílico);
 - c) solução de coloração 2 (tiazina basofílica).
2. Fixador: 1,8 mg de triarilmetano dissolvido em 1000 ml de metanol a 95% (v/v), opcional.
3. Fixador: metanol a 95% (v/v), opcional.

2.14.4.2 Fixação do esfregaço de sêmen seco

Mergulhar as lâminas em fixador de triarilmetano (como fornecido no kit Diff-Quik ou preparado como mostrado acima) por 15 segundos ou 95% de metanol sozinho por 1 hora. Drenar o excesso de solução colocando as lâminas verticalmente em papel absorvente.

2.14.4.3 Coloração do esfregaço de sêmen fixado

Submergir sequencialmente as lâminas em:

1. Solução rápida de coloração 1 10 segundos

- | | | |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| 2. Solução rápida de coloração | 2 | 5 segundos |
| 3. Água corrente da torneira | 10 a 15 vezes | para remover o excesso de coloração |

Drenar o excesso de solução a cada passo colocando as lâminas verticalmente em papel absorvente.

Nota 1: As lâminas podem ser visualizadas montadas ou desmontadas.

Nota 2: Se houver coloração de fundo alta, uma alíquota da amostra de sêmen deve ser lavada (ver Seção 2.13.2.4) e novas lâminas devem ser preparadas e coradas. A lavagem pode afetar a morfologia espermática e seu uso deve ser registrado.

2.14.4.4 Montando o esfregaço de sêmen corado

Ver Seções 2.14.2.4 e 2.14.2.5.

2.15 Examinando a preparação corada

Com preparações coradas, deve ser utilizada uma lente objetiva brightfield de imersão em óleo $\times 100$ e, pelo menos, uma lente ocular $\times 10$. Imagens mais claras são obtidas quando um fluido de índice de refração (RI) similar ao de células (aproximadamente 1,5) e vidro (1,50 a 1,58) é colocado entre a lente e a seção não montada ou lamela de vidro. Isso geralmente é óleo de imersão (RI 1,52). Os meios de montagem têm índices de refração similares (1,50 a 1,55: ver Quadro 2.14).

2.15.1 Classificação da morfologia normal dos espermatozoides

A avaliação da morfologia espermática está associada a uma série de dificuldades relacionadas à falta de objetividade, variação na interpretação ou baixo desempenho em avaliações externas de controle de qualidade (ver Seção 7.13.2). O método recomendado aqui é uma classificação simples normal/anormal, com registro opcional da localização de anormalidades em espermatozoides anormais. Os critérios de sobreposição devem ser aplicados ao avaliar a normalidade morfológica do espermatozoide (Kruger et al., 1986; Menkveld et al., 1990; Coetzee et al., 1998). O limite de referência dado (Seção 2.17.3) é válido somente quando é usada a técnica descrita abaixo.

Os espermatozoides consistem de uma cabeça, pescoço, peça intermediária (central), peça principal ou cauda e peça final. Como a peça final é difícil de ser vista com um microscópio de luz, a célula pode ser considerada como compreendendo uma cabeça (e pescoço) e cauda (peça intermediária e peça principal). Para que um espermatozoide seja considerado normal, tanto a cabeça quanto a cauda devem estar normais. Todas as formas limítrofes devem ser consideradas anormais.

- A cabeça deve ser lisa, regularmente contornada e geralmente ovalada. Deve haver uma região acrossomal bem definida compreendendo 40-70% da área da cabeça (Menkveld et al., 2001). A região acrossomal não deve conter grandes vacúolos e não mais que dois pequenos vacúolos, que não devem ocupar mais de 20% da cabeça do espermatozoide. A região pós-acrossomal não deve conter vacúolos.

- A peça intermediária deve ser delgada, regular e aproximadamente do mesmo comprimento que a cabeça do espermatozoide. O eixo principal da peça intermediária deve estar alinhado com o eixo principal da cabeça do espermatozoide. O citoplasma residual é considerado uma anomalia apenas quando está presente em excesso, ou seja, quando excede um terço do tamanho da cabeça do espermatozoide (Mortimer & Menkveld, 2001).
- A peça principal deve ter um calibre uniforme ao longo de seu comprimento, ser mais fina que a peça intermediária e ter aproximadamente 45 μm de comprimento (aproximadamente 10 vezes o comprimento da cabeça). Ela pode estar voltada para si mesma (ver Fig. 2.10c), desde que não haja um ângulo agudo indicativo de uma ruptura flagelar.

Comentário 1: Com esta técnica, a forma da cabeça do espermatozoide é mais importante do que suas dimensões, a menos que estas sejam grosseiramente anormais.

Comentário 2: Um micrômetro de lente ocular pode ser útil para distinguir cabeças de espermatozoides de tamanho normal e anormal.

Comentário 3: As dimensões da cabeça de 77 espermatozoides corados com Papanicolaou (corados pelo procedimento dado na Seção 2.14.2 e classificados como normais pelos critérios aqui indicados), medidos por um sistema computadorizado (coeficiente de variação para medidas repetidas 2-7%) tinham as seguintes dimensões: comprimento médio 4,1 μm , IC 95% 3,7-4,7; largura média 2,8 μm , IC 95% 2,5-3,2; razão comprimento-largura média 1,5, IC 95% 1,3-1,8.

Comentário 4: As partes médias de 74 espermatozoides corados com Papanicolaou (corados pelo procedimento dado na Seção 2.14.2 e classificados como normais pelos critérios aqui indicados) e medidos pelo mesmo sistema computadorizado, tinham as seguintes dimensões: comprimento médio 4,0 μm , IC 95% 3,3-5,2; largura média 0,6 μm , IC 95% 0,5-0,7.

Comentário 5: Caudas enroladas ($> 360^\circ$; ver Fig. 2.13m) podem indicar disfunção epididimária (Pelfrey et al., 1982).

Essa avaliação da morfologia normal dos espermatozoides pode ser mais bem aplicada aprendendo a reconhecer as variações sutis na forma de todo o espermatozoide (cabeças e caudas de espermatozoides normais/limitrofes; consulte a Seção 2.16, Placas 1-12 e seus comentários).

2.15.2 Classificação da morfologia anormal dos espermatozoides

Amostras de sêmen humano contêm espermatozoides com diferentes tipos de malformações. A espermatogênese defeituosa e algumas patologias do epidídimo são comumente associadas a um aumento da porcentagem de espermatozoides com formas anormais. Os defeitos morfológicos estão geralmente misturados. Espermatozoides anormais geralmente têm um menor potencial de fertilização, dependendo dos tipos de anomalias, e também podem ter DNA anormal. Os defeitos morfológicos têm sido associados ao aumento da fragmentação do DNA (Gandini et al., 2000), aumento da incidência de aberrações cromossômicas estruturais (Lee et al., 1996), cromatina imatura (Dadune et al., 1988) e aneuploidia (Devillard et al., 2002; Martin et al., 2003). A ênfase é, portanto, dada à forma da cabeça, embora também seja considerada a cauda do espermatozoide (peça central e peça principal).

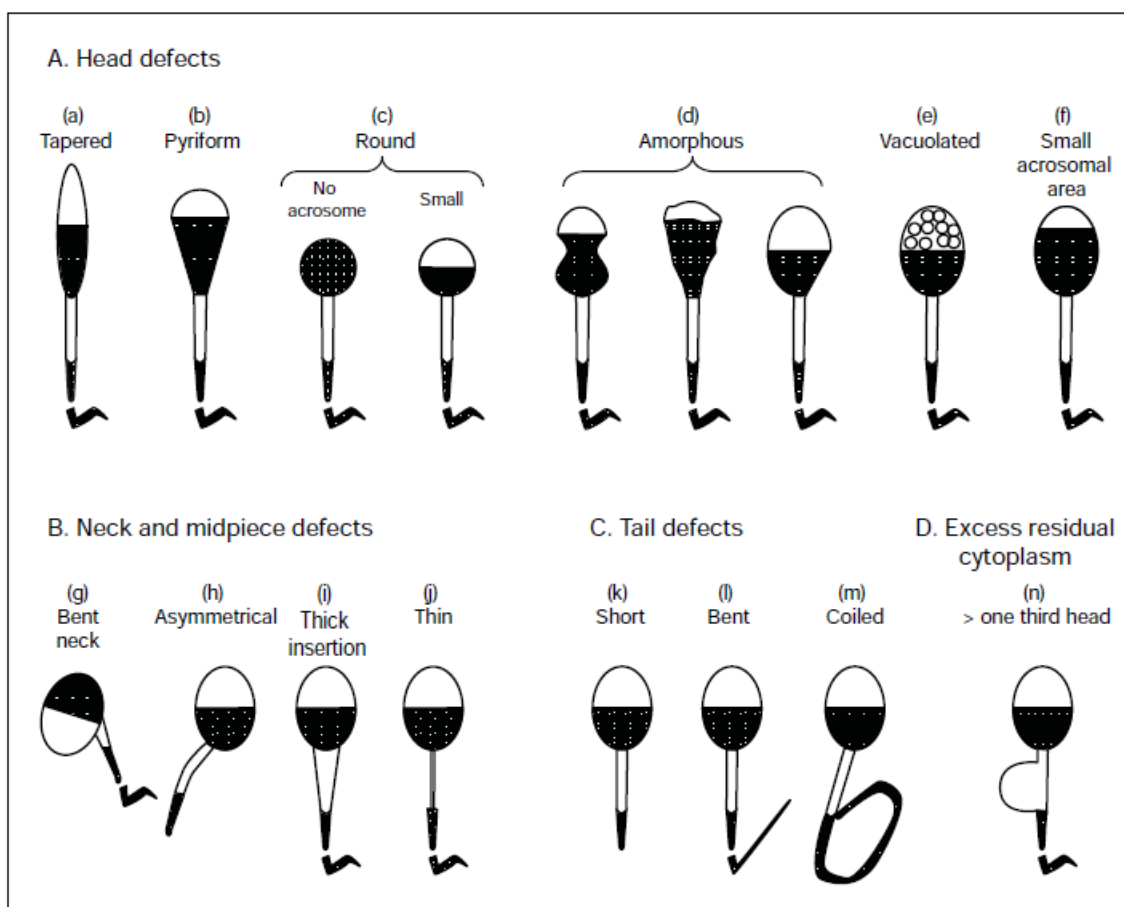
As seguintes categorias de defeitos devem ser anotadas (ver Fig. 2.13).

- Defeitos da cabeça: grande ou pequena, afilada, piriforme, redonda, amorfa, vacuolada (mais de dois vacúolos ou > 20% da área da cabeça ocupada por áreas vacuolares não coradas), vacúolos na região pós-acrossomal, áreas acrossomais pequenas ou grandes (< 40% ou > 70% da área da cabeça), cabeças duplas ou qualquer combinação destes.
- Defeitos do pescoço e da parte intermediária: inserção assimétrica da peça intermediária na cabeça, espessa ou irregular, acentuadamente dobrada, anormalmente fina ou qualquer combinação destes.
- Defeitos da peça principal: curta, múltiplas, quebradas, curvas anguladas agudas, curvas levemente anguladas, largura irregular, enroladas ou qualquer combinação dessas.
- Excesso de citoplasma residual (ERC): está associado a espermatozoides anormais produzidos a partir de um processo espermatogênico defeituoso. Os espermatozoides anormais caracterizam-se por grandes quantidades de citoplasma corado irregular, um terço ou mais do tamanho da cabeça do espermatozoide, muitas vezes associados a peças centrais defeituosas (Mortimer & Menkveld, 2001). Este excesso de citoplasma anormal não deve ser chamado de gotícula citoplasmática (Cooper, 2005).

Comentário 1: Gotículas citoplasmáticas (vesículas ligadas à membrana na peça intermediária na junção cabeça-pescoço) são componentes normais dos espermatozoides humanos fisiologicamente funcionais. Se inchadas, elas podem se estender ao longo do comprimento da peça intermediária, como observado por contraste de fase, contraste diferencial-interferência e microscopia de raios X de células vivas no sêmen, muco cervical e meio (Abraham-Peskir et al., 2002; Fetic et al., 2006).

Comentário 2: As gotículas citoplasmáticas são osmoticamente sensíveis e não são bem preservadas por procedimentos rotineiros de secagem ao ar (Chantler & Abraham-Peskir, 2004; Cooper et al., 2004). Elas não são óbvias em preparações coradas, onde podem aparecer como pequenas distensões da peça intermediária. As gotículas citoplasmáticas têm menos de um terço do tamanho da cabeça do espermatozoide em preparações fixas e coradas (Mortimer & Menkveld, 2001) e não são consideradas anormais.

Fig. 2.13 Desenhos esquemáticos de algumas formas anormais de espermatozoides humanos



A. Head defects	A. Defeitos da cabeça
(a) Tapered	(a) Cônico
(b) Pyriform	(b) Piriforme
(c) Round	(c) Redondo
No acrosome	Sem Acrossoma
Small	Pequeno
(d) Amorphous	(d) Amorfo
(e) Vacuolated	(e) Vacuolado
(f) Small acrosomal area	(f) Área acrossomal pequena
B. Neck and midpiece defects	B. Defeitos do pescoço e da parte intermediária
(g) Bent neck	(g) Pescoço curvado
(h) Asymmetrical	(h) Assimétrica
(i) Thick insertion	(i) Inserção espessa
(j) Thin	(j) Fina
C. Tail defects	C. Defeitos da cauda
(k) Short	(k) Curta
(l) Bent	(l) Curvada
(m) Coiled	(m) Enrolada
D. Excess residual cytoplasm	D. Citoplasma residual em excesso
(n) > one third head	(n) > um terço da cabeça

Adaptado de Kruger et al., 1993 e reproduzido com permissão da MQ Medical.

2.16 Placas morfológicas 1–14

Todas as micrografias das placas 1 a 14 foram avaliadas pela aplicação rigorosa dos critérios morfológicos apresentados acima. A análise da morfologia espermática é subjetiva e particularmente difícil de padronizar, uma vez que tenta traçar um ponto de corte artificial entre células normais e anormais, com base em uma infinidade de características de cabeças e caudas de espermatozoides. As placas que se seguem foram avaliadas por um único especialista, o Dr. Thinus Kruger. As avaliações foram complementadas com comentários adicionais para assegurar a consistência da notação de todas as anormalidades.

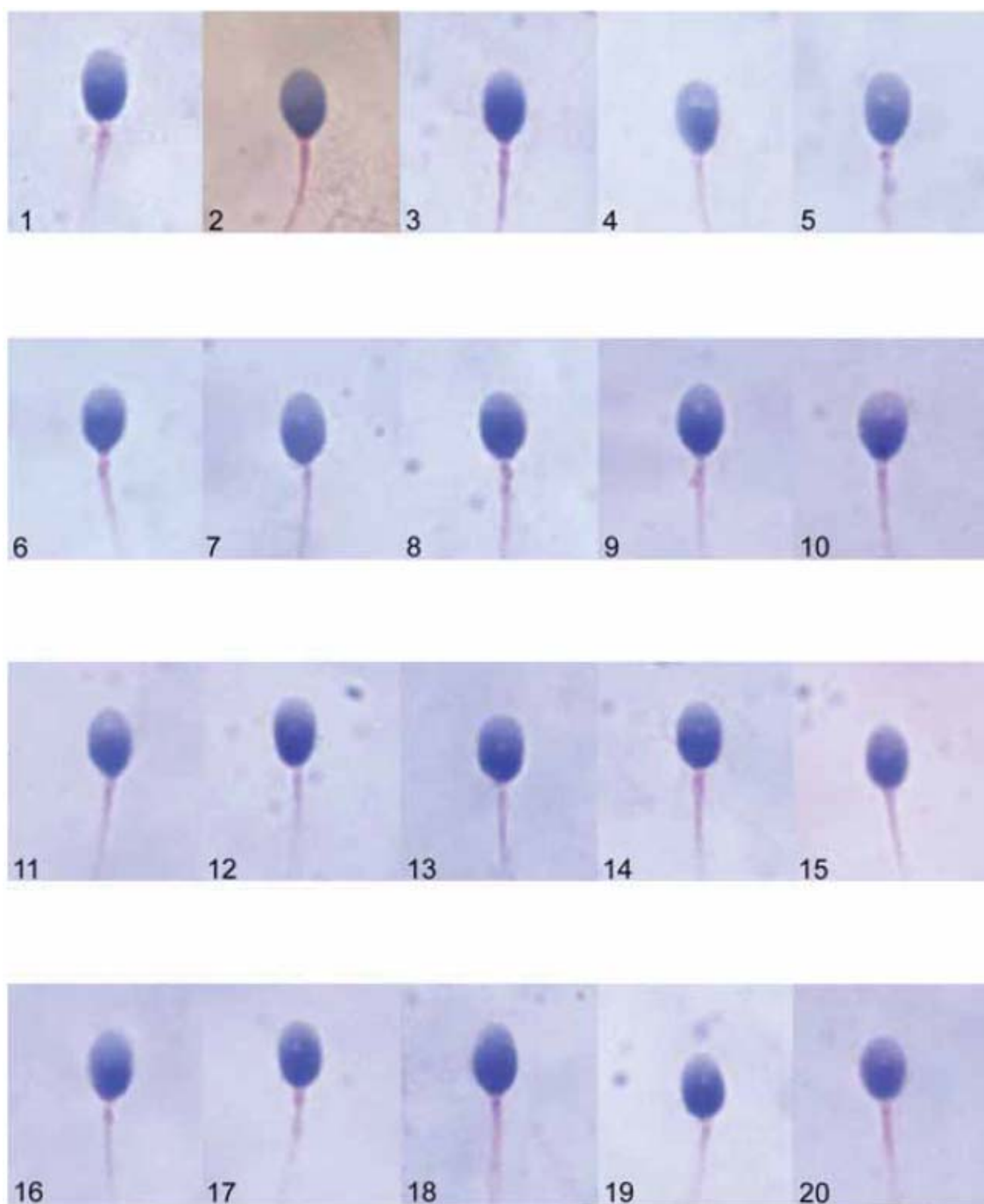
Em frente a cada placa colorida está uma tabela descrevendo a avaliação morfológica de cada espermatozoide representado. A tabela indica se a forma da cabeça é normal ou anormal, fornece detalhes das anormalidades da cabeça além da forma, indica se a peça intermediária ou principal tem forma normal e se o espermatozoide pode ser considerado normal no geral. Outras observações relevantes estão listadas em “comentários”. Os comentários são explicados em detalhe na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 Explicações usadas nos comentários das Placas 1–14

<40% acr	Menos de 40% da cabeça do espermatozoide é ocupada pelo acrossoma
>70% acr	Mais de 70% da cabeça do espermatozoide é ocupada pelo acrossoma
>um terço	Citoplasma anormal (mais de um terço do tamanho da cabeça) (ERC)
<um terço	Citoplasma normal (menos de um terço do tamanho da cabeça) (CD)
Anormal	Autoexplicativo
Amorfo	Forma da cabeça (ver Fig. 2.13d)
Bacilo	Bactéria
Curvado	Angulação anormalmente afiada (ver Fig 2.13g e j)
Enrolado	Autoexplicativo
CD	Gota citoplasmática
Citoplasma	Excesso de citoplasma residual ou gota citoplasmática, dependendo do tamanho
Leucócito degenerativo	Autoexplicativo
Espermátide degenerativo	Autoexplicativo
Defeito	Autoexplicativo
Duplo	Autoexplicativo
Célula epitelial	Do sistema de ducto masculino
ERC	Citoplasma residual em excesso (ver Fig. 2.13n)
Plano	Base de cabeça de espermatozoide não oval
Foco	Fora de foco (não avaliado)
Se PP OK	Nem toda a peça principal é vista na fotomicrografia (mas se fosse normal, o espermatozoide seria considerado normal)
Inser	O local de inserção da cauda é em um lado do eixo longo da cabeça
Irreg	Irregular no contorno
Em loop	Cauda curvada sobre si mesma
Macrófago	Leucócito fagocítico
Monócito	Leucócito agranular
Espermátide	Célula germinativa imatura
Não acro	Acrossoma ausente
Normal	Assemelhando-se aos encontrados no muco endocervical
Não avaliado	Por causa da sobreposição ou foco ruim
Sobreposição	Cabeças obscurecidas pela cauda
PA vac	Vacúolo na região pós-acrossomal
Cabeça de alfinete	Não é um espermatozoide; sem cromatina presente
Polimorfo	Leucócito polimorfonuclear
Piriforme	Forma da cabeça (ver Fig. 2.13b)
Redondo	Forma da cabeça (ver Fig. 2.13c)
Vista lateral	Vista lateral do espermatozoide
Pequeno	Tamanho da cabeça
Espermátide	Célula germinativa imatura
Espermatócito	Célula germinativa imatura
Cônico	Forma da cabeça (ver Fig. 2.13a)
Grosso	Autoexplicativo
Longo demais	Autoexplicativo
Vac	Vacúolo
>2 vac	Mais de dois vacúolos

Placa 1

10 micrômetros



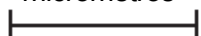
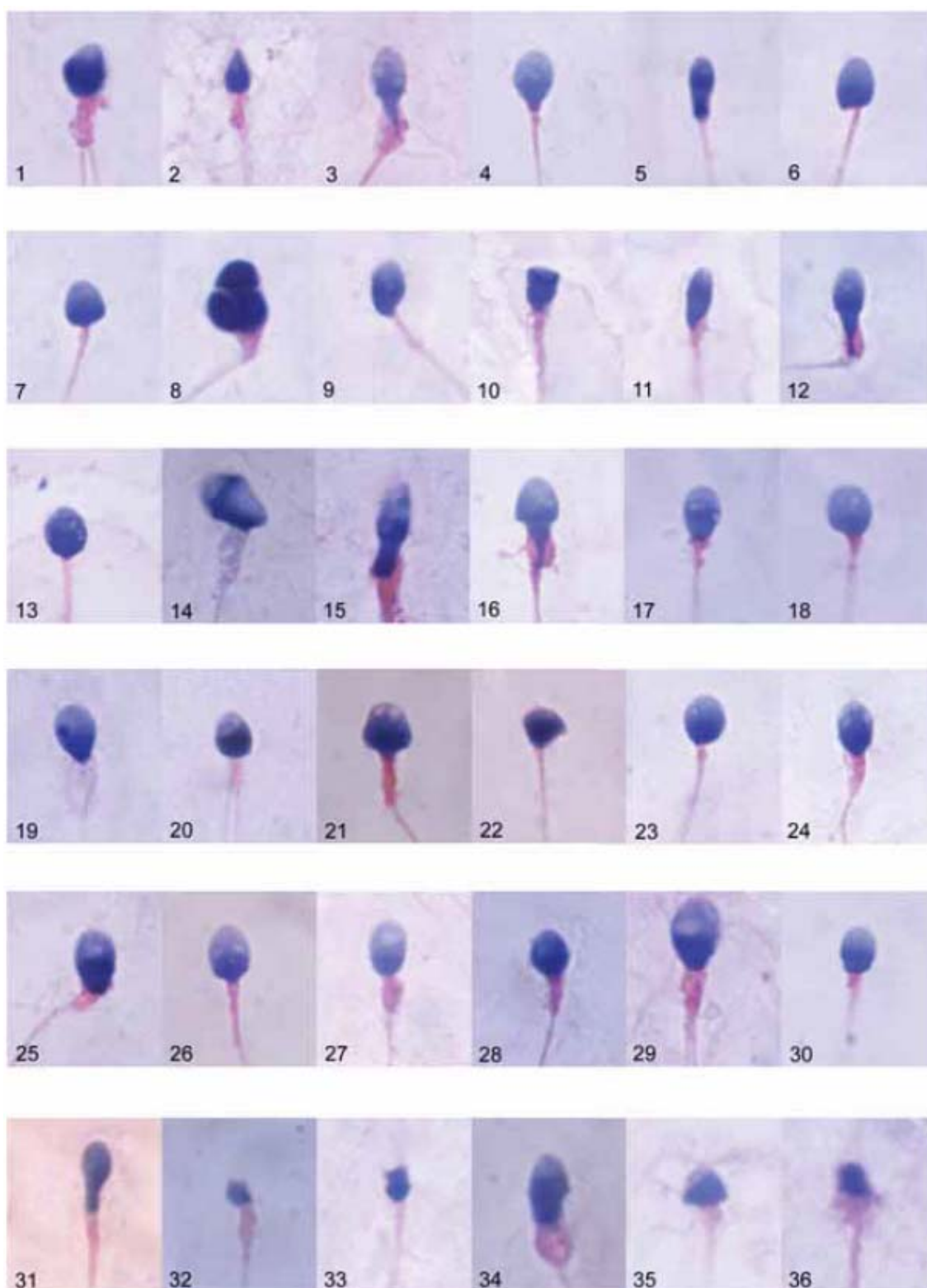
Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 1

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
2	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
3	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
4	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
5	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
6	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
7	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
8	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
9	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
10	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
11	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
12	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
13	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
14	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
15	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
16	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
17	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
18	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
19	Normal		Normal		Normal	Se PP OK
20	Normal		Normal		Normal	Se PP OK

Placa 2

10
micrômetros


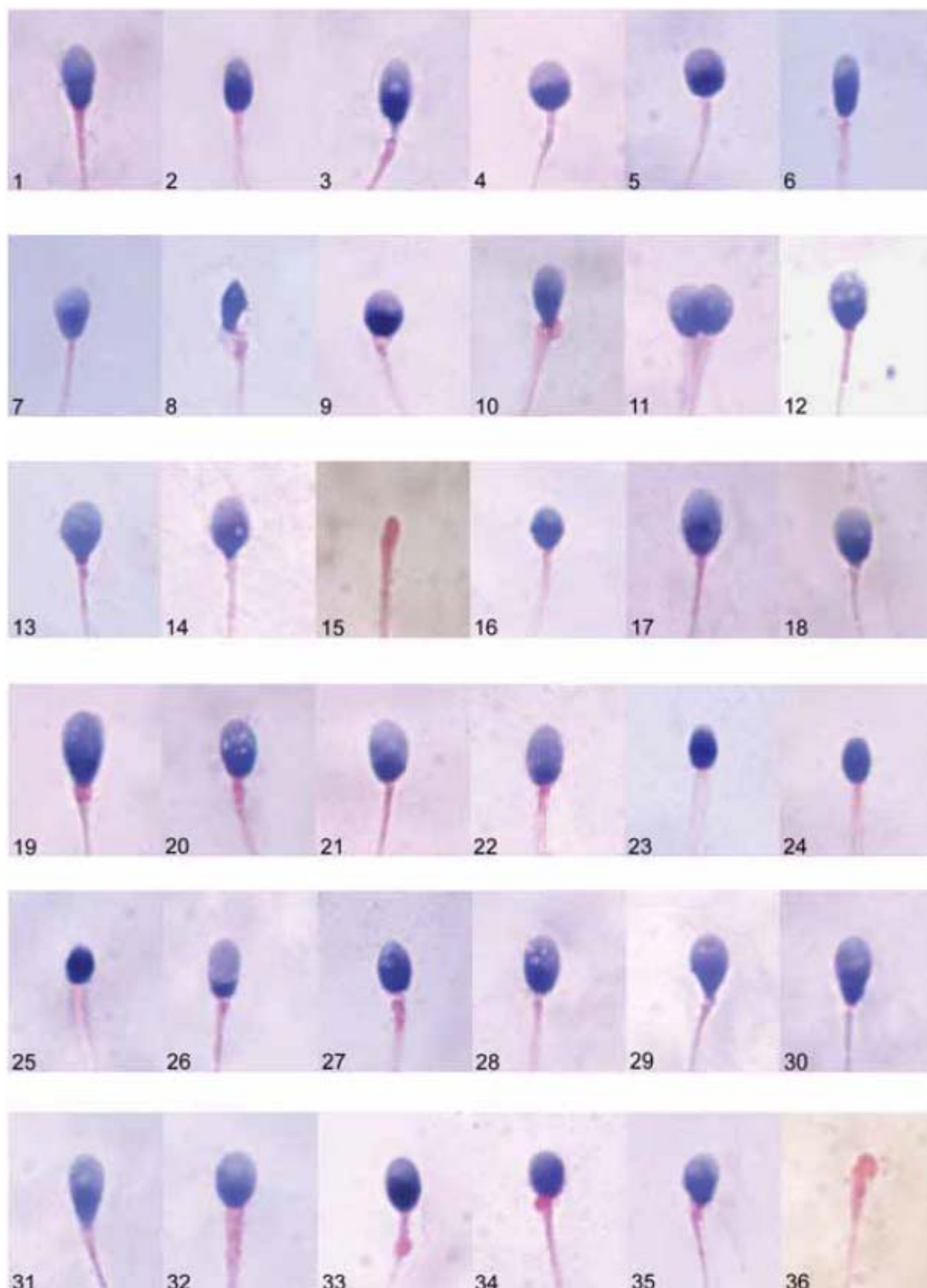
Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 2

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal		Grosso	Duplo	Anormal	
2	Anormal		Irreg		Anormal	Vista lateral
3	Anormal	Piriforme	Curvado, irreg, ERC		Anormal	>um terço
4	Anormal				Anormal	
5	Anormal	Piriforme			Anormal	
6	Anormal				Anormal	
7	Anormal				Anormal	
8	Anormal		Grosso		Anormal	
9	Anormal		Inser		Anormal	
10	Anormal				Anormal	
11	Anormal				Anormal	
12	Anormal	Piriforme		Curvado	Anormal	
13	Anormal	>2 vac, PA vac			Anormal	
14	Anormal		Grosso		Anormal	
15	Anormal	Piriforme	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
16	Anormal	Piriforme	ERC		Anormal	>um terço
17	Normal	PA vac			Anormal	
18	Anormal		Grosso, inser		Anormal	
19	Anormal		Anormal		Anormal	
20	Anormal		Grosso		Anormal	
21	Anormal		Grosso		Anormal	
22	Anormal				Anormal	
23	Anormal				Anormal	
24	Normal	>2 vac	Grosso		Anormal	
25	Anormal		Grosso, curvado		Anormal	
26	Anormal		Grosso		Anormal	
27	Anormal	>70% acr	Grosso		Anormal	
28	Anormal		Grosso		Anormal	
29	Anormal		Grosso		Anormal	
30	Anormal		Grosso		Anormal	
31	Anormal	Piriforme	Grosso		Anormal	
32	Anormal	Pequeno	Grosso		Anormal	
33	Anormal	Pequeno	Grosso		Anormal	
34	Anormal		ERC		Anormal	>um terço
35	Anormal		Grosso		Anormal	
36	Anormal		Grosso		Anormal	

Placa 3

10
micrômetros

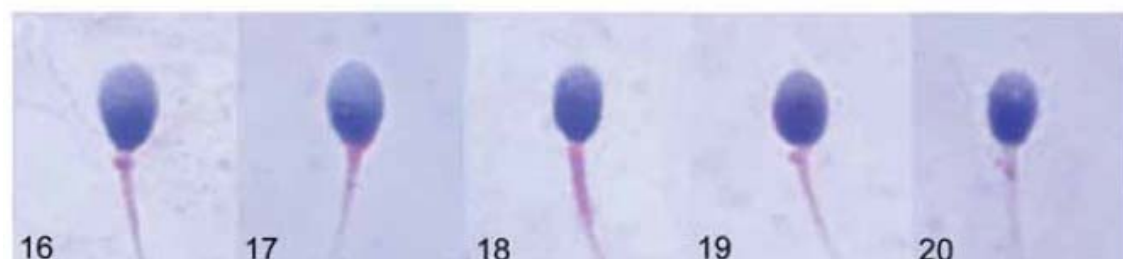

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 3

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal	Cônico	Grosso		Anormal	
2	Anormal				Anormal	
3	Anormal		Irreg		Anormal	
4	Anormal	Redondo			Anormal	
5	Anormal	Redondo			Anormal	
6	Anormal	Cônico			Anormal	
7	Anormal	Cônico			Anormal	
8	Anormal	Amorfo	Grosso		Anormal	
9	Anormal	Redondo	Grosso		Anormal	
10	Anormal	Cônico	Irreg, grosso		Anormal	
11	—				—	Duas células
12	Anormal	>2 vac, PA vac			Anormal	
13	Anormal				Anormal	
14	Normal	PA vac			Anormal	
15	—				—	Cabeça de alfinete
16	Anormal	Pequeno			Anormal	
17	Anormal	Grande			Anormal	
18	Normal		Grosso		Anormal	
19	Anormal		Grosso		Anormal	
20	Anormal	>2 vac	Inseri		Anormal	
21	Normal	>70% acr			Anormal	
22	Anormal	>70% acr			Anormal	
23	Anormal	<40% acr, pequeno			Anormal	
24	Anormal	<40% acr, pequeno			Anormal	
25	Anormal	<40% acr, pequeno			Anormal	
26	Anormal	>70% acr			Anormal	
27	Anormal	<40% acr, >2 vac	Irreg.		Anormal	
28	Normal	>2 vac			Anormal	
29	Anormal	Cônico			Anormal	
30	Anormal	Cônico			Anormal	
31	Anormal	Cônico			Anormal	
32	Normal		Grosso		Anormal	
33	Normal		Grosso		Anormal	
34	Anormal	<40% acr	Grosso		Anormal	
35	Anormal		Grosso, curvado		Anormal	
36	—				—	Cabeça de alfinete

Placa 4

10
micrômetros



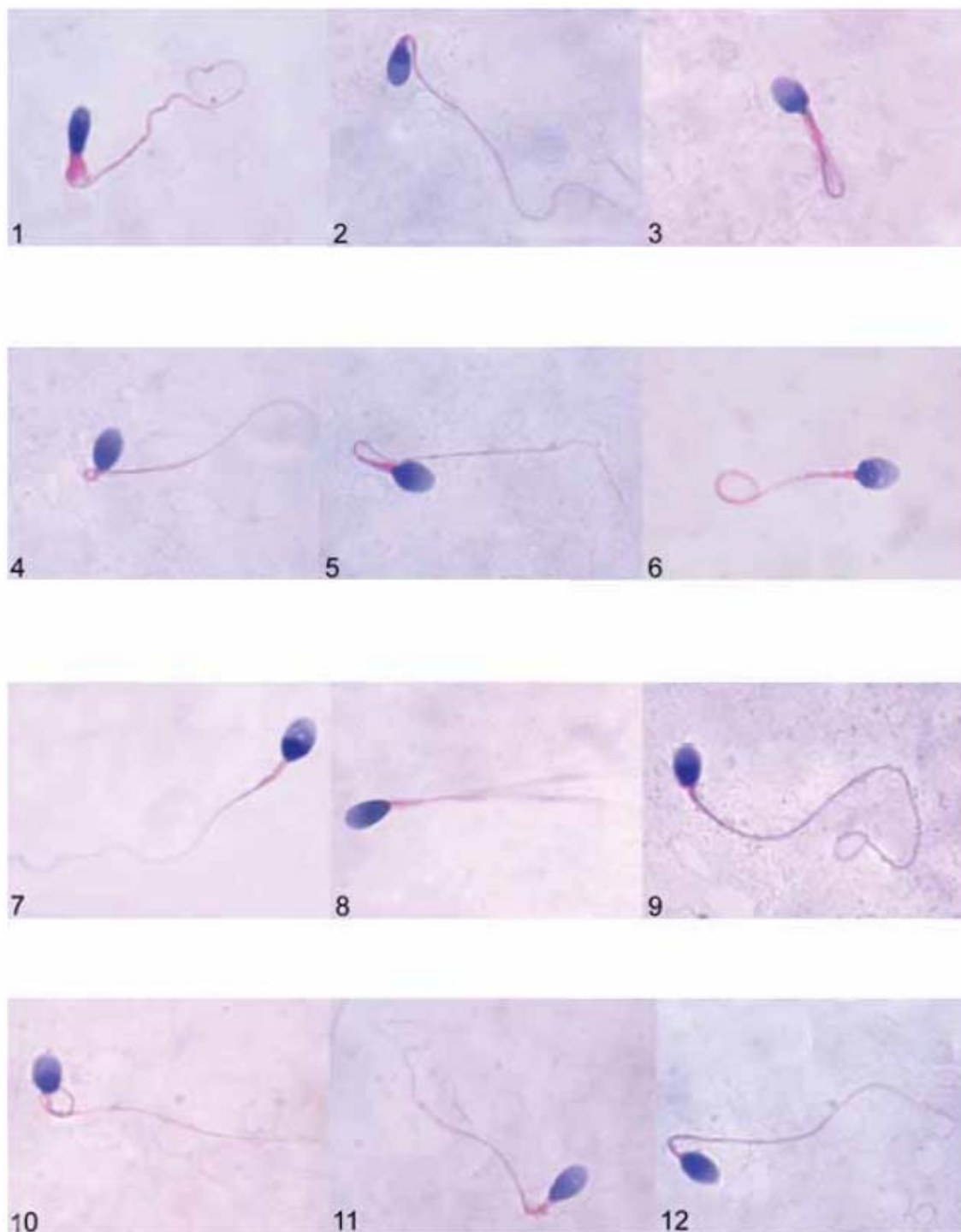

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 4

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal	Plano	Grosso		Anormal	
2	Normal		Grosso, curvado		Anormal	
3	Normal		Grosso		Anormal	
4	Normal		Grosso, curvado		Anormal	
5	Normal		Grosso		Anormal	
6	Normal		Grosso		Anormal	
7	Anormal	Irreg			Anormal	
8	Normal		Grosso		Anormal	
9	Normal		Inser, curvado		Anormal	
10	Normal		Grosso, curvado		Anormal	
11	Anormal	PA vac			Anormal	
12	Anormal				Anormal	
13	Anormal	<40% acr, >2 vac	Grosso		Anormal	
14	Normal		Irreg		Anormal	
15	Normal		Inseri		Anormal	
16	Normal		Grosso		Anormal	
17	Normal		Inser, grosso		Anormal	
18	Normal		Grosso, longo demais		Anormal	
19	Normal	<40% acr	Inser		Anormal	
20	Normal	<40% acr	Irreg		Anormal	

Placa 5

10
micrômetros



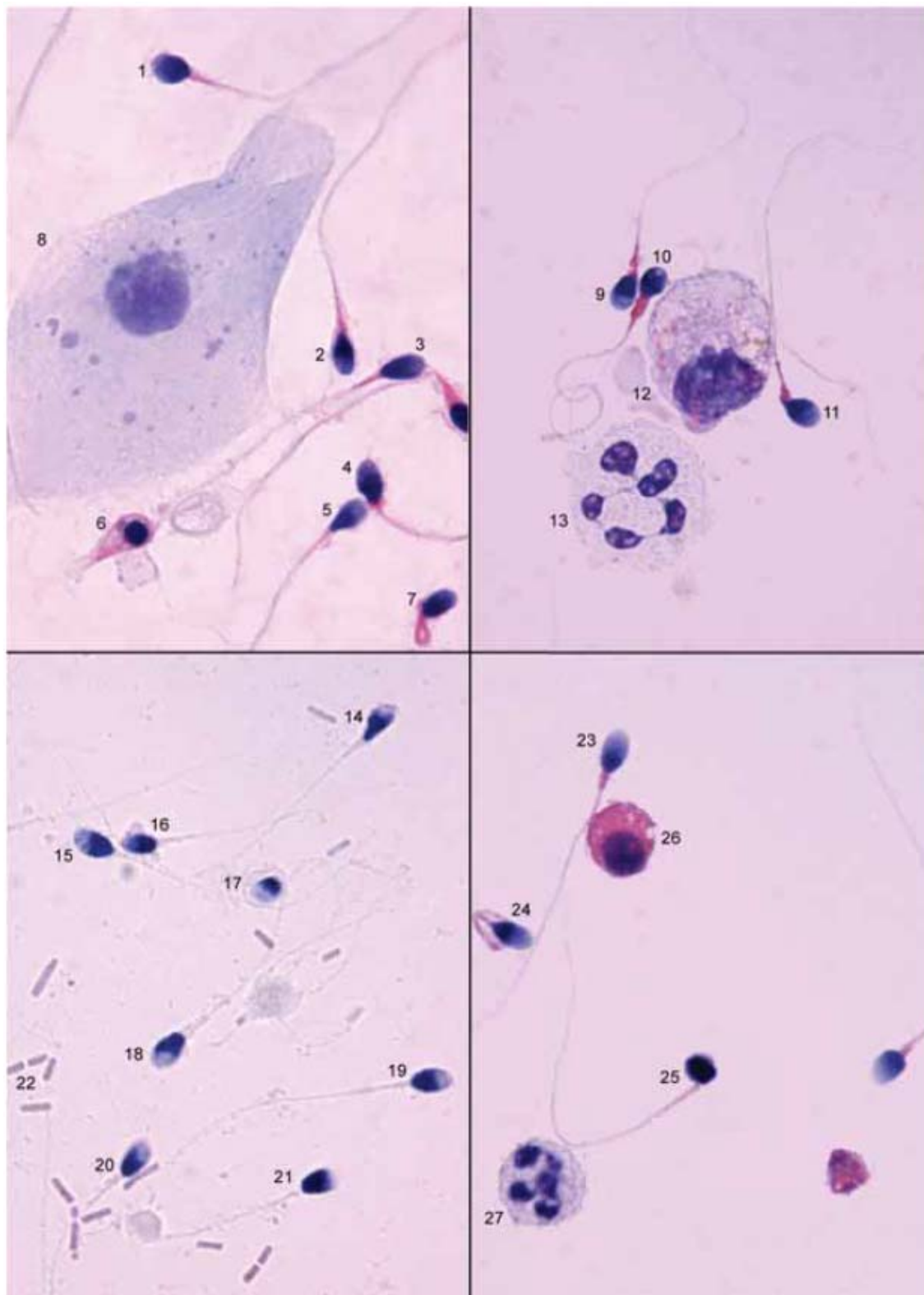

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 5

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediária	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal		ERC		Anormal	>um terço
2	Normal		Curvado	Normal	Anormal	
3	Anormal	>70% acr		Em loop	Anormal	
4	Normal		Curvado	Normal	Anormal	
5	Normal		Grosso	Em loop	Anormal	
6	Anormal	PA vac		Enrolado	Anormal	
7	Normal				Normal	
8	Normal			Duplo	Anormal	
9	Anormal			Enrolado	Anormal	
10	Anormal		Curvado, inser	Enrolado	Anormal	
11	Normal		Grosso	Curvado	Anormal	
12	Normal		Curvado	Normal	Anormal	

Placa 6

10
micrômetros



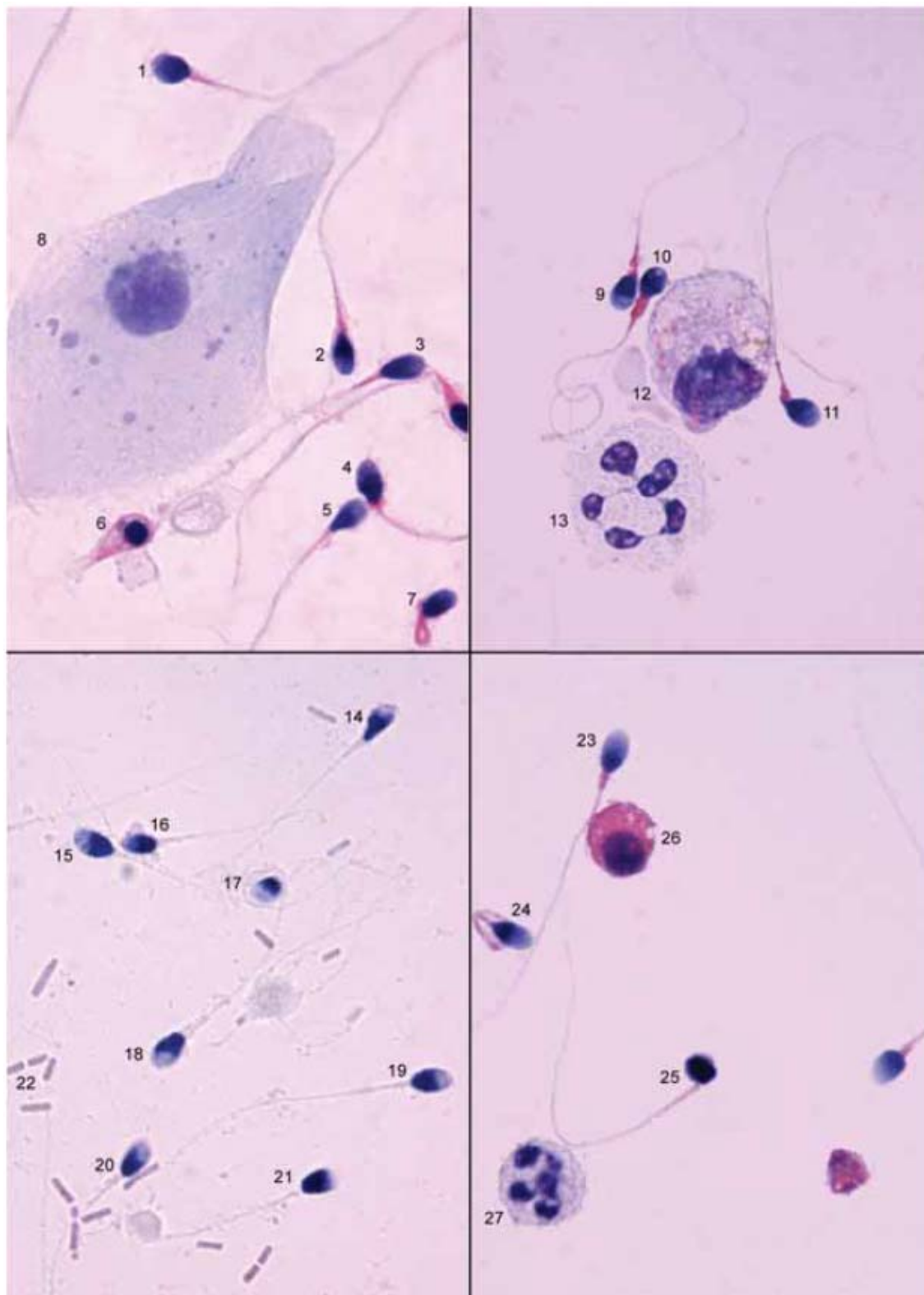

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 6

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentários
1	Normal	<40% acr	Grosso	Normal	Anormal	
2	Normal		Grosso		Anormal	
3	Normal				Normal	
4	Anormal		Grosso		Anormal	
5	Anormal	Cônico			Anormal	
6					Não classificável	Espermatozoi de anormal
7	Anormal		Grosso	Enrolado	Anormal	
8						Célula epitelial
9	Normal		Grosso, inser		Anormal	
10	Anormal	<40% acr	Grosso		Anormal	
11	Normal		Grosso		Anormal	
12						Macrófago degenerativo?
13						Polimorfo
14	Anormal	Piriforme			Anormal	
15	Normal				Normal	
16	Anormal	<40% acr			Anormal	
17	Anormal	Redondo		Não visto	Anormal	Cabeça livre?
18	Anormal		Grosso		Anormal	
19	Normal				Normal	
20	Normal				Normal	Se PP OK
21	Anormal	Plano			Anormal	
22						Bacilo
23	Normal		Grosso		Anormal	
24	Normal		Grosso	Enrolado	Anormal	
25	Anormal	Amorfo			Anormal	
26						Espermátide
27						Polimorfo

Placa 7

10
micrômetros



Micrografias cortesia de C Brazil.

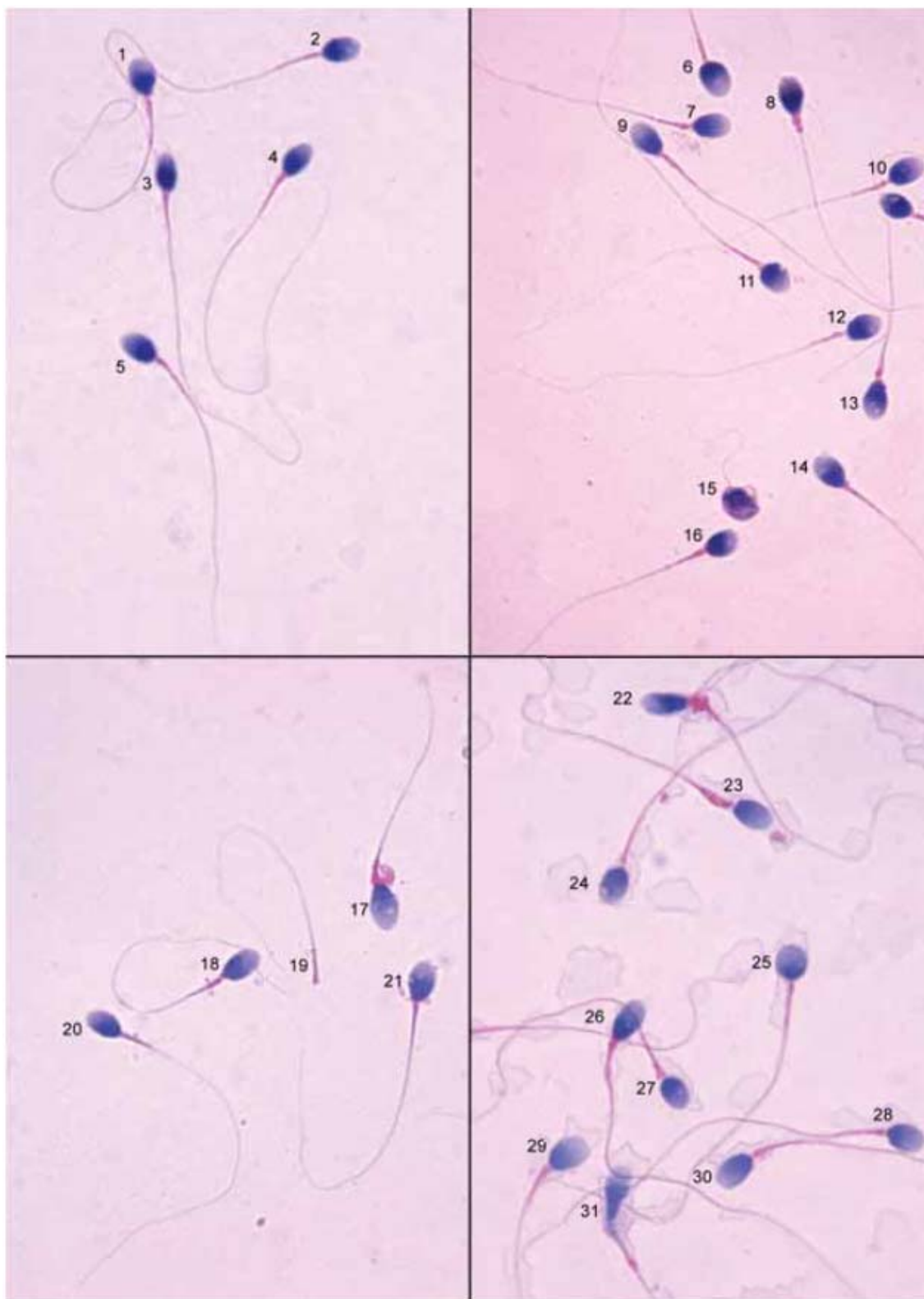

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 7

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Normal	2 vac			Normal	
2	Normal				Normal	
3	Normal		Grosso		Anormal	
4	Normal				Normal	
5	Normal				Normal	Se PP OK
6	Normal		Grosso		Anormal	
7	Normal	Vac na superfície			Normal	
8	Normal		CD		Normal	<um terço
9	Anormal		Grosso, ERC		Anormal	>um terço
10	Normal				Normal	
11	Normal	PA vac		Em loop	Anormal	
12	Normal				Normal	Se PP OK
13	Normal	PA vac			Anormal	
14	Normal	PA vac			Anormal	
15	Anormal	<40% acr	Grosso		Anormal	
16	Anormal	<40% acr			Anormal	
17	Normal				Normal	
18	Normal				Normal	Se PP OK
19	Normal		Grosso	Curta	Anormal	
20	Anormal		Grosso		Anormal	
21	Normal	>2 vac			Anormal	
22	Anormal	Redondo			Anormal	
23	Anormal	Redondo			Anormal	
24	Normal				Normal	
25						Cabeça de espermazoid e no citoplasma?
26	Normal				Normal	
27	Normal	Não acro		Enrolado	Anormal	
28	Normal				Normal	
29	Anormal	Redondo			Anormal	
30	Normal	PA vac			Anormal	
31	Anormal	Cônico, PA vac			Anormal	
32	Normal				Normal	Se PP OK
33	Normal				Normal	
34	Normal				Normal	Se PP OK
35	Anormal		Grosso	Curvado	Anormal	
36	Normal				Normal	Se PP OK
37	Normal				Normal	Se PP OK
38	Anormal	Redondo			Anormal	
39	Normal				Normal	
40	Normal				Normal	

41	Normal				Normal	
42	Normal		Grosso		Anormal	
43	Normal	<40 % acr			Anormal	
44		Fora de foco				Não avaliado
45	Anormal	Redondo			Anormal	
46	Anormal	Redondo			Anormal	
47	Normal				Normal	
48	Normal				Normal	Se PP OK

Placa 8

10
micrômetros




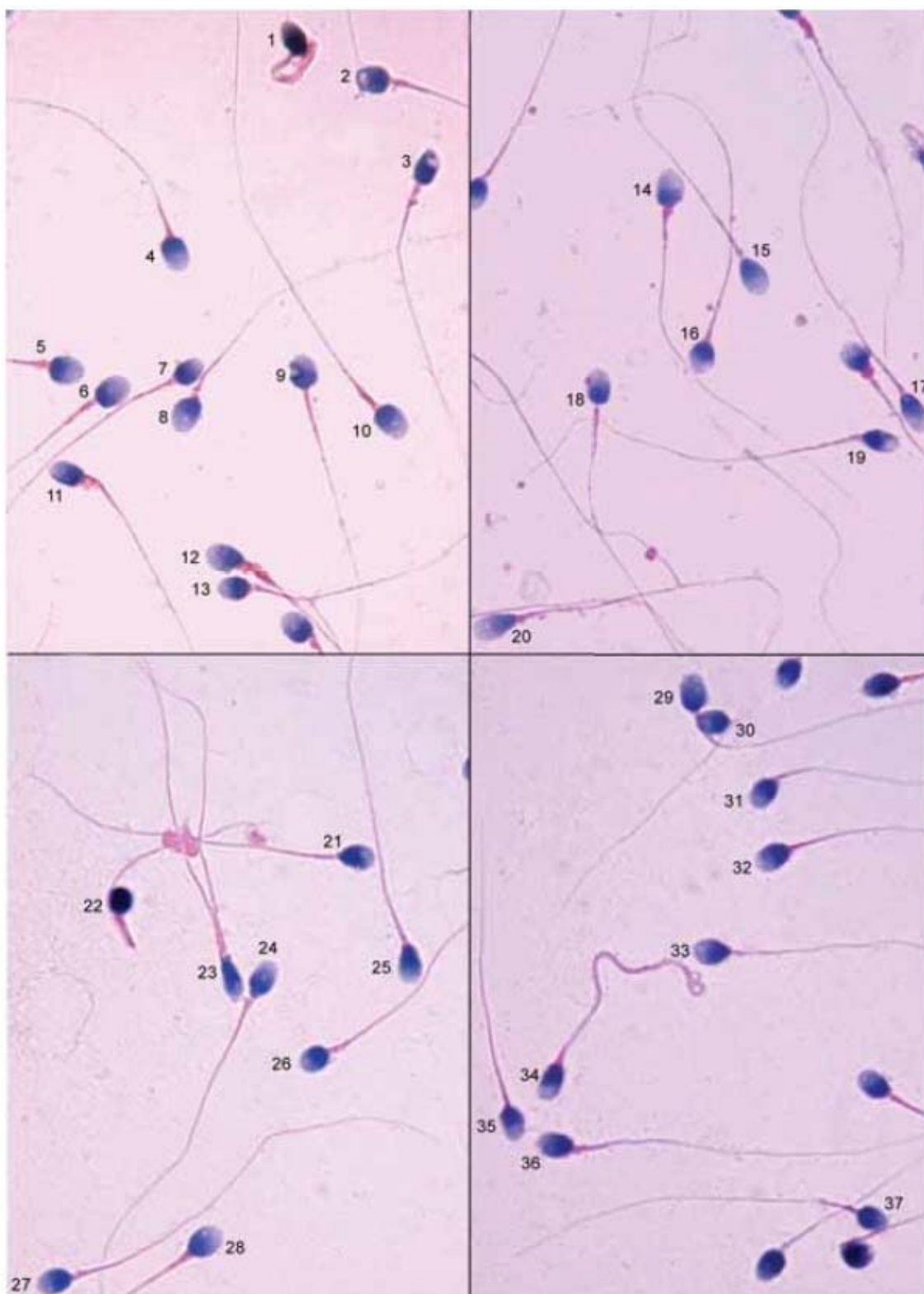
Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 8

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Normal			Normal	Normal	
2	Normal	>2 vac		Normal	Anormal	
3	Anormal	Cônico			Anormal	
4	Normal			Normal	Normal	
5	Normal				Normal	
6	Normal				Normal	Se PP OK
7	Normal				Normal	Se PP OK
8	Normal		Grosso		Anormal	
9	Normal				Normal	
10	Normal				Normal	
11	Normal	PA vac			Anormal	
12	Normal				Normal	
13	Anormal				Anormal	
14	Normal				Normal	Se PP OK
15	Anormal	Amorfo		Defeito	Anormal	
16	Normal				Normal	Se PP OK
17	Anormal	>70% acr	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
18	Normal				Normal	
19						Cabeça de alfinete
20	Normal				Normal	
21	Normal	PA vac			Anormal	
22	Anormal	Cônico	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
23	Anormal	Plano	Grosso		Anormal	
24	Normal	>2 vac			Anormal	
25	Anormal	Redondo			Anormal	
26	Normal		Grosso		Anormal	
27	Normal		Grosso		Anormal	
28	Normal	>2 vac, >70% acr			Anormal	
29	Anormal				Anormal	
30	Normal	>70% acr			Anormal	
31	Anormal	Piriforme			Anormal	

Placa 9

10
micrômetros

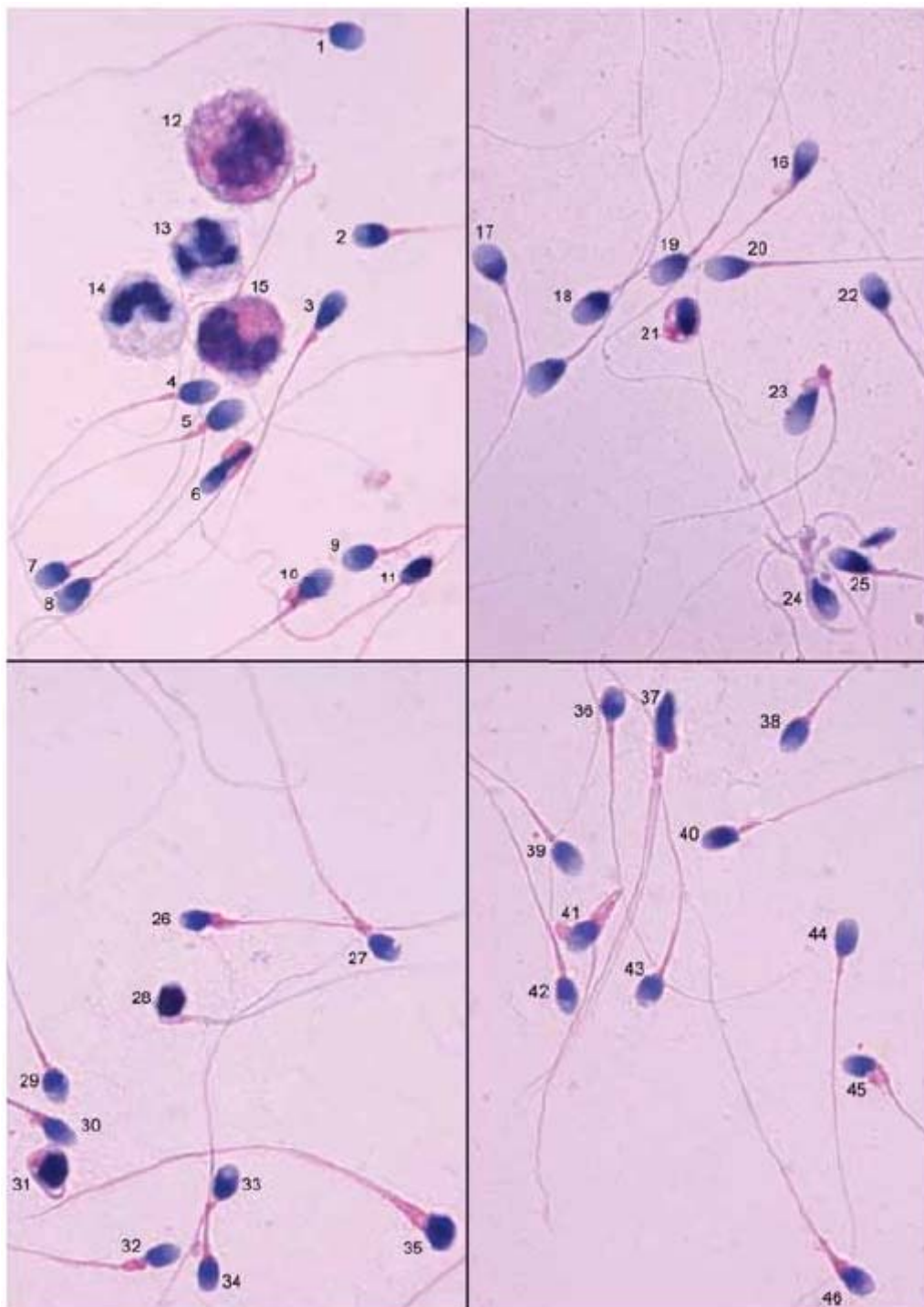

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 9

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediária	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal			Enrolado	Anormal	
2		Sobreposição				Não avaliado
3	Anormal	<40% acr			Anormal	
4	Normal				Normal	Se PP OK
5	Normal				Normal	Se PP OK
6	Normal	>70% acr	Inser		Anormal	
7	Normal		Inser		Anormal	
8	Normal	>70% acr	Inser		Anormal	
9	Anormal	PA vac			Anormal	
10	Normal	>2 vac	Grosso		Anormal	
11	Anormal		Grosso, ERC		Anormal	>um terço
12	Anormal		Grosso, inser, ERC		Anormal	>um terço
13	Normal				Normal	Se PP OK
14	Anormal		Grosso		Anormal	
15	Normal			Normal	Normal	
16	Anormal				Anormal	
17	Anormal	Cônico, 3 vac, PA vac			Anormal	
18	Normal				Normal	
19	Anormal	Vac >20%			Anormal	
20	Anormal	Cônico			Anormal	
21	Normal	PA vac			Anormal	
22	Anormal	Amorfo		Curvado	Anormal	
23	Anormal	Cônico		Duplo	Anormal	
24	Anormal	PA vac			Anormal	
25	Normal	>2 vac			Anormal	
26	Normal				Normal	Se PP OK
27	Normal				Normal	
28	Normal				Normal	Se PP OK
29		Sobreposição				Não avaliado
30		Sobreposição				Não avaliado
31	Normal				Normal	Se PP OK
32	Normal				Normal	Se PP OK
33	Normal				Normal	Se PP OK
34	Normal		Grosso	Grosso, enrolado	Anormal	
35	Anormal	1 lado não oval			Anormal	
36	Normal	<40% acr			Anormal	
37		Sobreposição				Não avaliado

Placa 10

10
micrômetros



Micrografias cortesia de C Brazil.

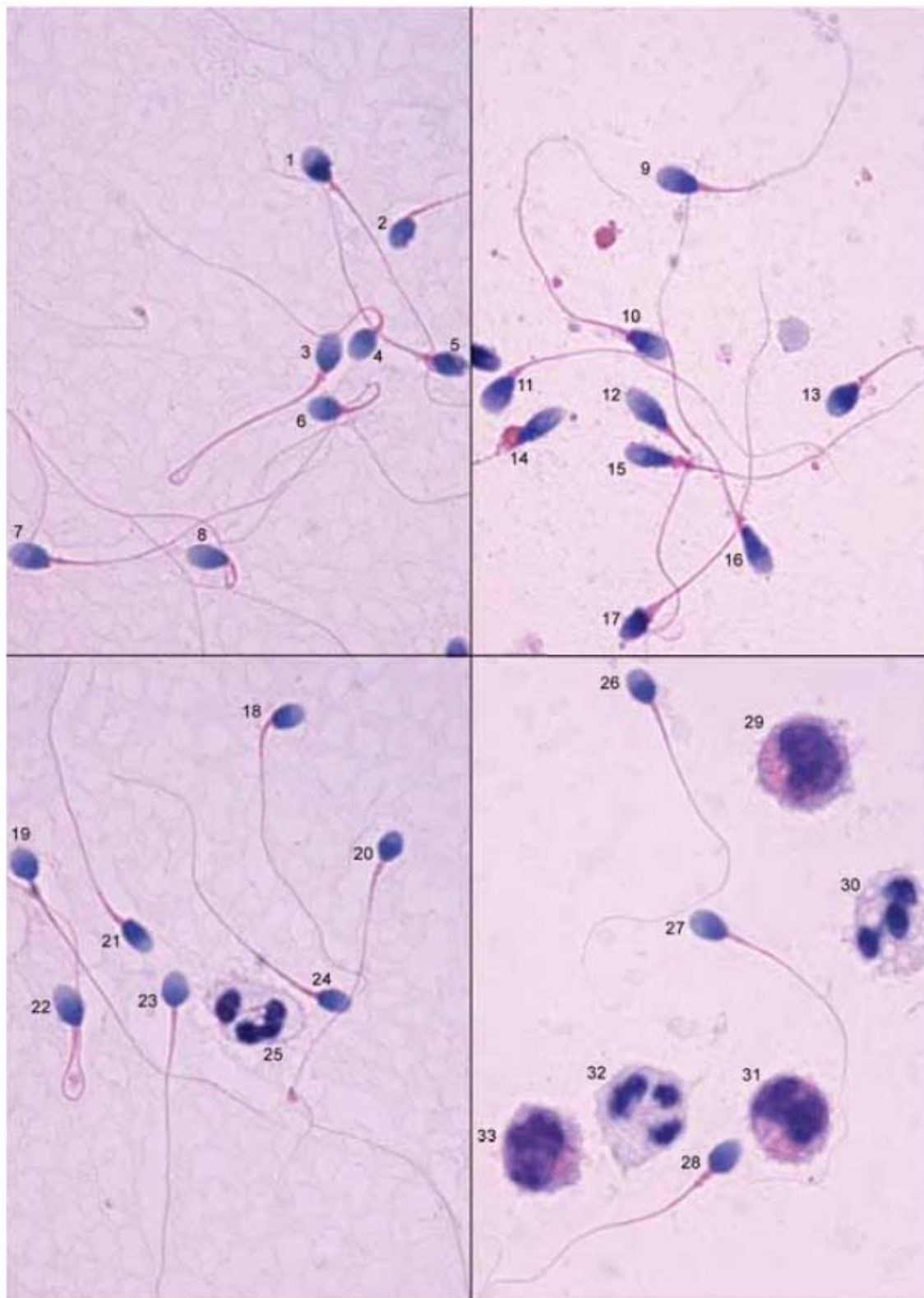

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 10

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Normal		Inser		Anormal	
2	Normal				Normal	Se PP OK
3	Anormal	Piriforme			Anormal	
4	Normal				Normal	
5	Normal		Grosso		Anormal	
6	Anormal	Piriforme	ERC	Curvado	Anormal	>um terço
7	Normal				Normal	
8	Normal				Normal	
9	Normal	3 vac			Anormal	
10	Anormal	Cônico	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
11	Anormal	Cônico, <40% acr		Curvado	Anormal	
12						Monócito
13						Polimorfo
14						Polimorfo
15						Monócito
16	Anormal	Cônico			Anormal	
17	Normal				Normal	Se PP OK
18	Normal				Normal	
19	Normal				Normal	
20	Normal				Normal	Se PP OK
21	Anormal	Amorfo			Anormal	
22	Normal				Normal	Se PP OK
23	Anormal	Cônico	Grosso	Curvado	Anormal	
24		Sobreposição				Não avaliado
25	Anormal	Cônico			Anormal	
26	Anormal	Amorfo	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
27	Normal		Grosso		Anormal	
28	Anormal	Amorfo	Grosso		Anormal	
29	Anormal	PA vac			Anormal	
30	Anormal		Grosso		Anormal	
31	Anormal		Grosso	Enrolado	Anormal	
32	Normal		Grosso		Anormal	
33		Sobreposição				Não avaliado
34		Sobreposição				Não avaliado
35	Anormal	Amorfo, não acro	Grosso		Anormal	
36	Normal	<40% acr			Anormal	
37	Anormal	Piriforme	Grosso	Duplo	Anormal	
38	Normal				Normal	Se PP OK

39	Normal		Grosso		Anormal	
40	Anormal	<40% acr			Anormal	
41	Anormal		Grosso	Curvado	Anormal	
42	Normal				Normal	Se PP OK
43	Normal	2 vac, <40% acr			Anormal	
44	Normal				Normal	
45	Anormal		Grosso, ERC		Anormal	>um terço
46	Anormal		Grosso		Anormal	

Placa 11

10
micrômetros




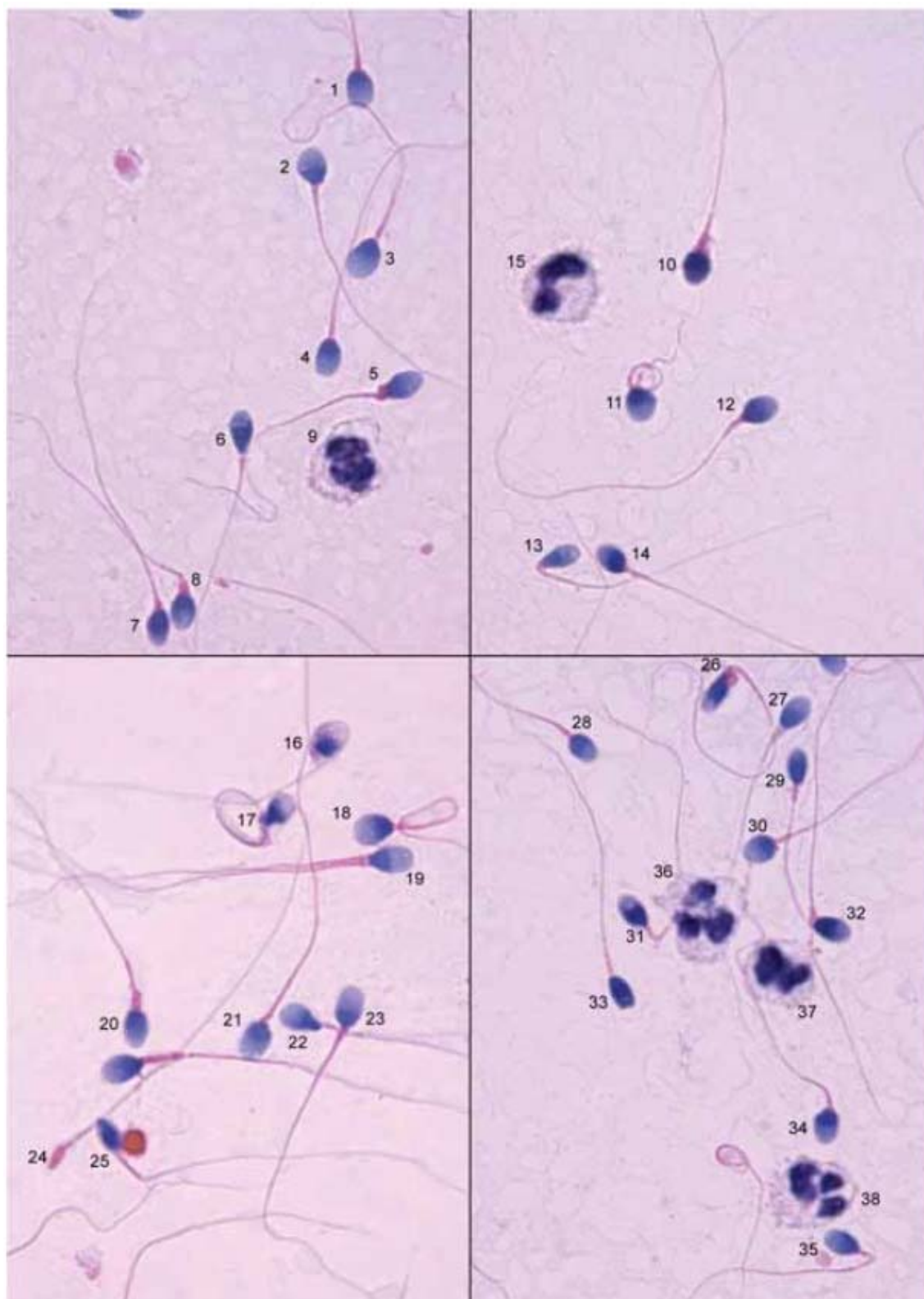
Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 11

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Anormal		Inser		Anormal	
2	Anormal		Inser		Anormal	
3	Normal		Grosso	Em loop	Anormal	
4	Normal				Normal	
5	Anormal	>2 vac, <40% acr	Grosso		Anormal	
6	Normal			Em loop	Anormal	
7	Anormal		Inser		Anormal	
8	Normal			Em loop	Anormal	
9	Anormal	>70% acr, cônico			Anormal	
10	Anormal	Cônico			Anormal	
11	Normal		Grosso		Anormal	
12	Anormal	Cônico			Anormal	
13	Normal	<40% acr	Grosso		Anormal	
14	Anormal	Cônico	Grosso, ERC		Anormal	>um terço
15	Anormal	Cônico	Grosso		Anormal	
16	Anormal	Cônico			Anormal	
17	Anormal	Amorfo	Grosso		Anormal	
18	Normal				Normal	
19	Normal				Anormal	
20	Anormal				Anormal	
21	Anormal				Anormal	
22	Normal	>70% acr		Em loop	Anormal	
23	Normal				Normal	
24	Normal				Normal	
25						Polimorfo
26	Normal				Normal	
27	Normal				Normal	
28	Normal	>70% acr			Anormal	
29						Monócito
30						Polimorfo
31						Monócito
32						Polimorfo
33						Monócito

Placa 12

10
micrômetros

Micrografias cortesia de C Brazil.


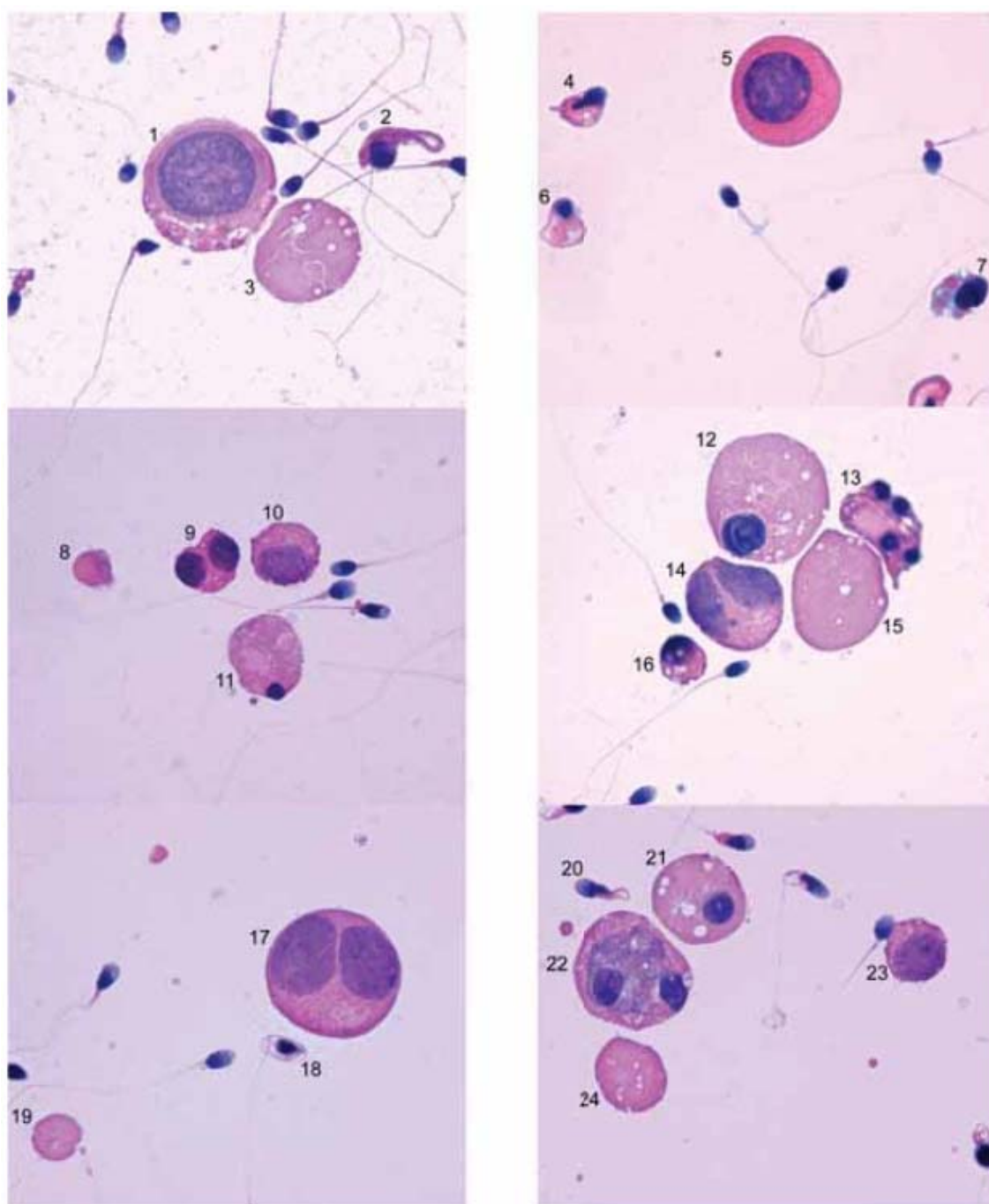
Avaliação morfológica dos espermatozoides na placa 12

Esperm a	Forma da cabeça	Outros comentários da cabeça	Comentário s da peça intermediári a	Comentário s da peça principal	Classificação geral de espermatozoide s	Comentário s
1	Normal	>70% acr			Anormal	
2	Anormal				Anormal	
3	Anormal	>70% acr			Anormal	
4	Normal				Normal	Se PP OK
5	Anormal		Grosso		Anormal	
6	Anormal	Cônico			Anormal	
7		Não em foco	Grosso			Não avaliado
8	Anormal		Grosso, curvado		Anormal	
9						Leucócito degenerativ o
10	Anormal		Grosso		Anormal	
11	Anormal	Redondo		Enrolado	Anormal	
12	Normal				Normal	
13	Anormal	Cônico	Curvado		Anormal	
14	Anormal		Inser		Anormal	
15						Polimorfo
16	Anormal	Amorfo			Anormal	
17	Anormal			Enrolado	Anormal	
18	Anormal		Grosso	Enrolado	Anormal	
19	Normal			Duplo	Anormal	
20	Anormal		Grosso		Anormal	
21		Sobreposição				Não avaliado
22	Anormal	Piriforme			Anormal	
23	Normal				Normal	
24	Anormal				Anormal	Cabeça de alfinete
25	Anormal	Amorfo		Curvado	Anormal	
26	Anormal	Amorfo	Grosso, curvado		Anormal	
27	Normal		Grosso		Anormal	
28	Normal				Normal	Se PP OK
29	Anormal	Cônico			Anormal	
30	Anormal	Redondo			Anormal	
31	Normal		Curvado	Sobreposiç ão		Não avaliado
32	Normal		Grosso, curvado		Anormal	
33	Anormal				Anormal	
34	Anormal				Anormal	
35	Normal		Curvado		Anormal	
36						Polimorfo
37						Polimorfo

38						Polimorfo
----	--	--	--	--	--	-----------

Placa 13

15
micrômetros

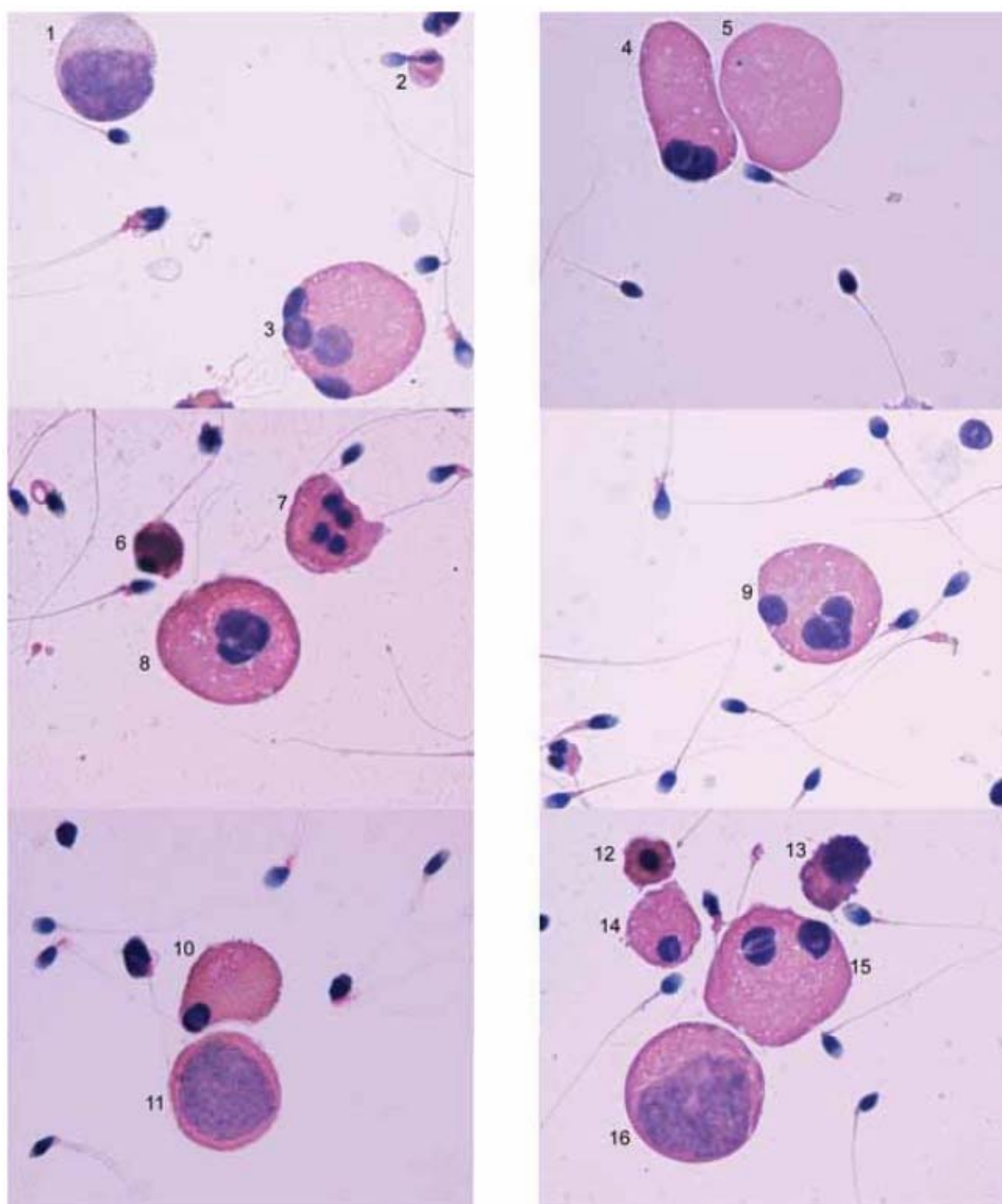

Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação de células na placa 13

Célula	Tipo de célula
1	Macrófago
2	Espermatozoide anormal
3	Citoplasma
4	Espermatozoide anormal
5	Espermatócito
6	Espermatozoide anormal
7	Espermatozoide anormal? Cabeça solta no citoplasma?
8	Citoplasma
9	Espermátide em divisão
10	Espermatócito
11	Espermátide degenerativo
12	Espermátide
13	Espermátide degenerativo
14	Espermatócito em divisão
15	Citoplasma
16	Espermátide degenerativo
17	Espermatócito em divisão
18	Espermatozoide anormal
19	Citoplasma
20	Espermatozoide anormal
21	Espermátide
22	Macrófago fagocitando
23	Espermatócito
24	Citoplasma

Placa 14

15
micrômetros



Micrografias cortesia de C Brazil.

Avaliação de células na placa 14

Célula	Tipo de célula
1	Macrófago
2	Espermatozoide anormal
3	Espermátide (em divisão)
4	Espermátide (em divisão)
5	Citoplasma
6	Não classificável
7	Espermátide degenerativo
8	Espermátide degenerativo?
9	Espermátide degenerativo
10	Espermátide degenerativo
11	Macrófago
12	Espermátide degenerativo
13	Espermátide degenerativo
14	Espermátide degenerativo
15	Espermátide degenerativo
16	Macrófago

2.17 Analisando a morfologia do espermatozoide

2.17.1 Avaliação da morfologia dos espermatozoides normais

Pode ser suficiente para determinar a proporção de espermatozoides normais. As regiões funcionais do espermatozoide são consideradas neste modelo de avaliação morfológica. Não é necessário distinguir todas as variações no tamanho e forma da cabeça ou os vários defeitos da peça central e da peça principal.

A avaliação morfológica deve ser realizada em todos os espermatozoides avaliáveis em várias áreas sistematicamente selecionadas da lâmina, para evitar a seleção tendenciosa de espermatozoides específicos.

- Examinar a lâmina usando óptica de campo claro com ampliação $\times 1000$ com imersão em óleo.
- Avaliar todos os espermatozoides em cada campo, passando de um campo microscópico para outro.
- Avaliar pelo menos 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
- Registrar o número de espermatozoides normais e anormais com auxílio de um contador de laboratório.
- Repetir a avaliação de pelo menos 200 espermatozoides, de preferência na lâmina replicada, mas alternativamente na mesma lâmina.
- Comparar as percentagens de formas morfológicas normais das duas avaliações independentes.
- Calcular a média e a diferença das duas percentagens de formas normais das avaliações replicadas.
- Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Cada uma mostra a diferença máxima entre duas percentagens que se espera que ocorra em 95% das amostras devido ao erro de amostragem isolado).

- Se a diferença entre as porcentagens for aceitável, relatar a porcentagem média da morfologia normal. Se a diferença for muito alta, repetir a avaliação nas mesmas lâminas (ver Quadro 2.6).
- Informar a porcentagem média de formas normais para o número inteiro mais próximo.

Nota 1: Avalie apenas os espermatozoides intactos, definidos como tendo uma cabeça e uma cauda (veja a Seção 2.7.3), uma vez que apenas os espermatozoides intactos são contados para a concentração espermática. Não conte células germinativas (redondas) imaturas.

Nota 2: Não avalie espermatozoides sobrepostos e aqueles que estão com a cabeça na borda; estes não podem ser analisados adequadamente. Eles não deveriam estar presentes em um esfregaço bom (consulte a Seção 2.13.2.1), mas pode acontecer quando detritos e uma grande quantidade de material particulado estão presentes (como no sêmen viscoso: consulte a Seção 2.13.2.3). Estas amostras devem ser lavadas (ver Seção 2.13.2.4) e as lâminas devem ser examinadas antes da coloração.

2.17.2 Exemplos práticos

Exemplo 1. As porcentagens de espermatozoides com morfologia normal em contagens replicadas de 200 espermatozoides são 18 e 9. A média arredondada é de 14% e a diferença é de 9%. Na Tabela 2.1 vê-se que, para uma média de 14%, seria esperada uma diferença de até 7% apenas por acaso. Como a diferença observada excede isso, os resultados são descartados e as lâminas reavaliadas na réplica.

Exemplo 2. As porcentagens de espermatozoides com morfologia normal em contagens replicadas de 200 espermatozoides são 10 e 14. A média arredondada é de 12% e a diferença é de 4%. Na Tabela 2.1 vê-se que, para uma média de 12%, seria esperada uma diferença de até 7% apenas por acaso. Como a diferença observada é menor do que isso, os resultados são aceitos e o valor médio informado, ou seja, 12% das formas normais:

2.17.3 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para formas normais é de 4% (5º percentil, IC 95% 3,0-4,0).

Comentário: O número total de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado é de significância biológica. Isto é obtido pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado (ver Seção 2.8.7) pela porcentagem de célula com formas normais.

2.17.4 Avaliação da morfologia dos espermatozoides anormais

A categorização de todas as formas anormais de espermatozoides pode ser de benefício diagnóstico ou de pesquisa. Se desejado, observe a natureza dos defeitos e calcule a porcentagem de espermatozoides com defeitos de cabeça (% H), peça intermediária (% M) ou peça principal (% P) e aqueles com excesso de citoplasma residual (% C).

Um contador diferencial pode ser usado, com uma tecla para normal, uma para anormal e uma para cada uma das quatro categorias anormais (H, M, P, C). Tal contador permite que cada espermatozoide seja contado apenas uma vez e cada uma de suas anomalias seja pontuada separadamente.

- A partir da avaliação final de 400 espermatozoides é possível obter a porcentagem de espermatozoides normais e anormais (os dois números devem chegar a 100%), bem como a porcentagem com cada tipo de anormalidade, ou seja, %H, %M, %P e %C (esses números não irão totalizar 100%).
- A porcentagem de espermatozoides nessas classes de anormalidade é obtida dividindo-se o número total de espermatozoides anormais com um defeito específico pelo número total de espermatozoides normais e anormais marcados $\times 100$. Esses números também podem ser usados para calcular vários índices de anomalias (consulte a Seção 3.1).

2.17.5 Exemplo prático

Exemplo. De 200 espermatozoides marcados com um contador diferencial de seis teclas para o replicado 1, 42 espermatozoides são classificados como normais e 158 como anormais. Dos 158 espermatozoides anormais, 140 têm defeitos na cabeça, 102 têm defeitos na peça do meio, 30 têm defeitos na peça principal e 44 têm excesso de citoplasma residual. Os resultados da réplica 2 são 36 espermatozoides normais e 164 anormais, dos quais 122 têm defeitos na cabeça, 108 têm defeitos na peça do meio, 22 têm defeitos na peça principal e 36 têm citoplasmas residuais em excesso.

Apenas a categoria normal é comparada quanto à aceitabilidade de replicações. A réplica 1 tem 21% de espermatozoides normais e a réplica 2 tem 18%. A média desses valores é 19,5% (arredondados para 20%) e a diferença é de 3%. Na Tabela 2.1 vê-se que, para uma média de 20%, seria esperada uma diferença de até 8% apenas por acaso. Como a diferença observada é menor do que isso, os resultados são aceitos e os valores médios relatados: formas normais $(42 + 36)/400 = 20\%$, cabeças anormais $(140 + 122)/400 = 66\%$, peças médias anormais $(102 + 108)/400 = 53\%$, peças principais anormais $(30 + 22)/400 = 13\%$ e percentual com excesso de citoplasma residual $(44 + 36)/400 = 20\%$.

Nota: Estas categorias não somam 100%, uma vez que cada anormalidade é calculada separadamente e alguns espermatozoides têm vários defeitos.

Comentário: Uma análise mais detalhada dos espermatozoides anormais, com vários índices que combinam o número de anormalidades em cada região por espermatozoide anormal, é dada na Seção 3.1.1.

2.17.6 Avaliação dos defeitos espermáticos específicos

Ocasionalmente, muitos espermatozoides terão um defeito estrutural específico. Por exemplo, o acrossoma pode não se desenvolver, dando origem ao “pequeno defeito de cabeça redonda” ou “globozoospermia”. Se a placa basal não se liga ao núcleo no polo oposto do acrossoma na espermição, as cabeças são absorvidas e somente as caudas são encontradas no sêmen (o defeito de cabeça do alfinete).

Nota 1: Cabeças de alfinete (caudas livres) não são contadas como defeitos de cabeça, uma vez que não possuem cromatina ou estrutura da cabeça anterior à placa basal.

Nota 2: Como as caudas livres (cabeças de alfinete) e as cabeças livres não são contadas como espermatozoides (definidas como tendo cabeça e cauda, consulte a Seção 2.7.3), elas não são consideradas anormalidades espermáticas.

Homens cujos espermatozoides exibem um desses defeitos geralmente são inférteis. Esses casos são raros, mas é fundamental que eles sejam identificados e

corretamente relatados. Assim, devem-se relatar a presença de defeitos espermáticos específicos, ex. cabeças livres, cabeças de alfinete (caudas livres), cabeças sem acrossomas.

Se houver muitos desses defeitos, sua prevalência relativa aos espermatozoides pode ser determinada. Se N é o número de células com defeitos contados no mesmo número de campos que 400 espermatozoides e S é a concentração de espermatozoides (10^6 por ml), então a concentração (C) dos defeitos (10^6 por ml) pode ser calculada com a fórmula $C = S \times (N/400)$.

2.18 Avaliação de leucócitos no sêmen

Leucócitos, predominantemente leucócitos polimorfonucleares (PMN, neutrófilos), estão presentes na maioria dos ejaculados humanos (Tomlinson et al., 1993; Johannisson et al., 2000). Eles podem, às vezes, ser diferenciados de espermátides e espermatócitos em um esfregaço de sêmen corado com o método de Papanicolaou (ver Seção 2.14.2). A diferenciação é baseada em diferenças na coloração, no tamanho e na forma nuclear (Johannisson et al., 2000) (ver as Figuras 6, 10, 11, 12, 13 e 14). Os leucócitos polimorfonucleares podem ser facilmente confundidos morfológicamente com espermátides multinucleadas, mas corados em uma cor azulada, em contraste com a coloração mais rosada das espermátides (Johannisson et al., 2000). O tamanho nuclear também pode ajudar na identificação: os núcleos dos monócitos exibem uma ampla variação de tamanho, de aproximadamente 7 μm para linfócitos a mais de 15 μm para macrófagos. Esses tamanhos são apenas diretrizes, já que a degeneração e a divisão afetam o tamanho do núcleo.

Existem várias outras técnicas para quantificar a população de leucócitos no sêmen. Como os granulócitos positivos à peroxidase são a forma predominante de leucócitos no sêmen, o ensaio rotineiro da atividade da peroxidase é útil como uma técnica de triagem inicial (Wolff, 1995; Johannisson et al., 2000) (ver Seção 2.18.1).

Os leucócitos podem ser ainda diferenciados com ensaios imunocitoquímicos mais demorados e dispendiosos contra antígenos de leucócitos e espermatozoides comuns (Homyk et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992) (ver Seção 3.2).

2.18.1 Coloração de peroxidase celular usando orto-toluidina

Este teste é rápido e barato, sendo uma triagem inicial útil para granulócitos.

2.18.1.1 Princípio

Tradicionalmente, os leucócitos no sêmen humano são contados após um procedimento histoquímico que identifica a enzima peroxidase, que é característica dos granulócitos (Fig. 2.14). Essa técnica tem a vantagem de ser relativamente fácil de executar, mas não detecta:

- Polimorfos ativados que têm liberado seus grânulos;
- Outros tipos de leucócitos, como linfócitos, macrófagos e monócitos, que não contêm peroxidase.

O teste pode ser útil para distinguir leucócitos polimorfonucleares de espermátides multinucleadas, que são livres de peroxidase (Johannisson et al., 2000). O ensaio abaixo é baseado em Nahoum & Cardozo (1980). Um kit para isso está disponível comercialmente.

2.18.1.2 Reagentes

1. Tampão fosfato, 67 mmol/l, pH 6,0: dissolver 9,47 g de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) em 1000 ml de água purificada e 9,08 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em 1000 ml de água purificada. Adicionar uma solução à outra (aproximadamente 12 ml de solução de Na_2HPO_4 a 88 ml de solução de KH_2PO_4) até que o pH seja 6,0.
2. Solução saturada de cloreto de amônio (NH_4Cl): adicionar 250 g de NH_4Cl a 1000 ml de água purificada.
3. Ácido etilenodiaminotetracético dissódico (Na_2EDTA) 148 mmol/l: dissolver 50 g/l em tampão fosfato (pH 6,0) preparado no passo 1.
4. Substrato: dissolver 2,5 mg de o-toluidina em 10 ml de solução salina a 0,9% (9 g/l).
5. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% (v/v): conforme adquirido.
6. Solução de trabalho: a 9 ml de substrato o-toluidina, adicionar 1 ml de solução saturada de NH_4Cl , 1 ml de Na_2EDTA 148 mmol/l e 10 μl de H_2O_2 a 30% (v/v) e misturar bem. Esta solução pode ser usada até 24 horas após a preparação.

Nota: A Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1982) declarou que a orto-toluidina deve ser considerada, para fins práticos, como se apresentasse um risco carcinogênico para os seres humanos. Tome as precauções necessárias (consulte o Apêndice 2).

2.18.1.3 Procedimento

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Remover uma alíquota de 0,1 ml de sêmen e misturar com 0,9 ml de solução de trabalho (diluição 1 + 9 (1: 10)).
3. Agitar a suspensão de esperma (em um agitador vórtex) por 10 segundos e incubar à temperatura ambiente por 20-30 minutos. Alternativamente, agitar continuamente com um sistema de balanço de tubos.
4. Misturar novamente a amostra de sêmen antes de remover uma alíquota replicada e misturar com a solução de trabalho como acima.

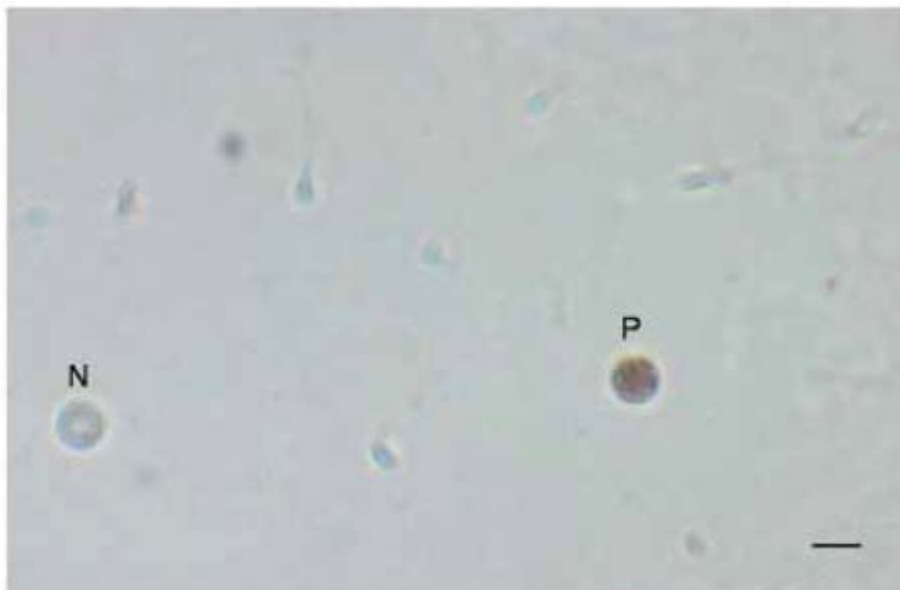
2.18.1.4 Avaliação do número de células positivas para peroxidase nas câmaras do hemocitômetro

1. Após 20 a 30 minutos, misturar as suspensões de esperma novamente e preencher cada lado de um hemocitômetro com uma das preparações replicadas.
2. Armazenar o hemocitômetro horizontalmente por pelo menos 4 minutos à temperatura ambiente em uma câmara úmida (por exemplo, em papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar ressecamento e permitir que as células se estabeleçam.

3. Examinar a câmara com óptica de contraste de fase com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$.
4. Contar pelo menos 200 células positivas para peroxidase em cada réplica, a fim de alcançar um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2). As células positivas para peroxidase serão coradas de marrom, enquanto as células negativas para peroxidase não serão coradas (Fig. 2.14).
5. Examinar uma câmara, grade por grade, e continuar contando até que pelo menos 200 células positivas para peroxidase tenham sido observados e uma grade completa tenha sido examinada. A contagem deve ser feita por grades completas; não pare no meio de uma grade.
6. Anotar o número de grades avaliadas para alcançar pelo menos 200 células positivas para peroxidase. O mesmo número de grades será contado na outra câmara do hemocítômetro.
7. Registrar o número de células positivas para peroxidase e grades com auxílio de um contador de laboratório.
8. Alternar para a segunda câmara do hemocítômetro e realizar a contagem replicada no mesmo número de grades da primeira réplica, mesmo que isso dê menos de 200 células positivas para peroxidase.
9. Calcular a soma e a diferença dos dois números de células positivas para peroxidase.
10. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.5 ou da Figura A7.1, Apêndice 7. (Cada um mostra a diferença máxima entre as duas contagens que se espera que ocorram em 95% das amostras por causa do erro de amostragem isolado).
11. Se a diferença for aceitável, calcular a concentração (veja a Seção 2.18.1.5). Se a diferença for muito alta, preparar duas novas diluições e repetir a estimativa da contagem replicada (ver Quadro 2.10).
12. Relatar a concentração média de células positivas para peroxidase em dois organismos significativos.
13. Calcular o número total de células positivas para peroxidase por ejaculação (ver Comentários após a Seção 2.18.1.8).

Fig. 2.14 Células positivas e negativas para peroxidase no sêmen humano

Granulócito positivo para peroxidase (P) (cor marrom) e célula redonda negativa para peroxidase (N).
Escala 10 μm .



Micrografia cortesia de TG Cooper.

2.18.1.5 Cálculo da concentração de células positivas para peroxidase no sêmen

A concentração de células positivas para peroxidase no sêmen é o seu número (N) dividido pelo volume do número total (n) de grades examinadas para as réplicas (onde o volume de uma grade é de 100 nl), multiplicado pelo fator de diluição.

Para uma diluição 1 + 9 (1: 10), a concentração é $C = (N/n) \times (1/100) \times 10$ células por nl = $(N/n) \times (1/10)$ células por nl. Assim (N/n) é dividido por 10 para obter a concentração de células positivas para peroxidase por nl (10^6 células por ml).

Quando todas as nove grades em cada câmara do hemocitômetro são avaliadas, o número total de células positivas para peroxidase pode ser dividido pelo volume total de ambas as câmaras (1,8 µl) e multiplicado pelo fator de diluição (10), para obter a concentração em células por µl (mil células por ml).

Nota: Este procedimento pode ser usado para calcular a concentração de células redondas quando o número total de células redondas contadas (peroxidase positivas e negativas) é usado para N no cálculo.

2.18.1.6 Sensibilidade do método

Se houver menos de 200 células positivas para peroxidase na câmara, o erro de amostragem excederá 5%. Quando encontrar menos de 400 células positivas para peroxidase em todas as grades de ambas as câmaras, informe o erro de amostragem para o número de células contadas (ver Tabela 2.2).

Se menos de 25 células positivas para peroxidase forem contados em cada câmara, a concentração será <277.000 células por ml; este é o limite inferior de quantificação para um erro de amostragem de 20% quando todas as nove grades da câmara de Neubauer melhorada são avaliadas em uma diluição 1 + 9 (1: 10) (Cooper et al., 2006). Relate o número de células positivas para peroxidase observados com o comentário "Poucas células contadas para uma determinação precisa da concentração ($<277.000/\text{ml}$)".

Comentário: A ausência de células positivas para peroxidase na alíquota examinada não

significa necessariamente que estejam ausentes do resto da amostra.

2.18.1.7 Exemplos práticos

Exemplo 1. Com uma diluição 1 + 9 (1: 10), verificou-se que a réplica 1 contém 60 células positivas para peroxidase em todas as nove grades, enquanto a réplica 2 contém 90 células positivas para peroxidase nas nove redes. A soma dos valores (60 + 90) é 150 em 18 grades e a diferença (90-60) é 30. A partir da Tabela 2.5, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (24), então os resultados serão descartados e novas réplicas serão feitas.

Exemplo 2. Com uma diluição 1 + 9 (1: 10), verificou-se que a réplica 1 contém 204 células positivas para peroxidase em todas as cinco grades, enquanto a réplica 2 contém 198 células positivas para peroxidase nas cinco redes. A soma dos valores (204 + 198) é 402 em 10 grades e a diferença (204-198) é 6. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (39), portanto os valores são aceitos.

A concentração de células positivas para peroxidase na amostra, para uma diluição de 1 + 9 (1: 10), é $C = (N/n) \times (1/10)$ células por nl ou $(402/10)/10 = 4,02$ células/nl, ou $4,0 \times 10^6$ células por ml (para dois algarismos significativos).

Exemplo 3. Com uma diluição 1 + 9 (1: 10), verificou-se que a réplica 1 contém 144 células positivas para peroxidase em todas as nove grades, enquanto a réplica 2 contém 162 células positivas para peroxidase nas nove redes. A soma dos valores (144 + 162) é 306 em 18 grades e a diferença (162-144) é 18. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (34), portanto os valores são aceitos.

Quando todas as nove grades são avaliadas em cada câmara, a concentração da amostra, para uma diluição de 1 + 9 (1: 10), é $C = (N/1,8) \times 10$ células por μl = $(306/1,8) \times 10 = 1700$ células por μl ou $1,7 \times 10^6$ células por ml (para duas figuras significativas). Como menos de 400 células foram contadas, relatar o erro de amostragem para 306 células indicadas na Tabela 2.2 (aproximadamente 6%).

Exemplo 4. Com uma diluição de 1 + 9 (1: 10), não são encontradas células positivas para peroxidase em qualquer dos replicados. Como menos de 25 células positivas para peroxidase são encontradas em todas as nove grades, a concentração é < 277.000 por ml; informe que “não foram observadas células positivas para peroxidase nas amostras. Poucas células para determinação precisam da concentração ($<277.000/\text{ml}$)”.

2.18.1.8 Valor de referência

Atualmente, não há intervalo de referência para células positivas para peroxidase no sêmen de homens férteis. Na pendência de evidências adicionais, este manual mantém o valor de consenso de $1,0 \times 10^6$ células positivas para peroxidase por ml como valor limiar.

Comentário 1: O número total de células positivas para peroxidase no ejaculado pode refletir a gravidade de uma condição inflamatória (Wolff, 1995). É obtido pela multiplicação da concentração de células positivas para peroxidase pelo volume de todo o ejaculado.

Comentário 2: Relatos de valores de corte para células positivas para peroxidase em homens férteis variam de $0,5 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^6$ leucócitos PMN por ml ou de 1×10^6 a 2×10^6 leucócitos totais por ml (Wolff, 1995). Edições anteriores deste manual levaram em conta 1×10^6 leucócitos por ml como o limiar para a leucocitospermia. Alguns acharam este valor muito baixo (Wolff, 1995), enquanto outros o consideram muito alto (Sharma et al., 2001; Punab et al., 2003), dependendo do objetivo examinado (qualidade do sêmen, resultados da fertilização in vitro, presença de bactérias, resposta espermática a espécies reativas de oxigênio).

Comentário 3: Um número excessivo de leucócitos no ejaculado (leucocitospermia, pirospemia) pode estar associado a infecção e má qualidade do esperma.

Comentário 4: O dano aos espermatozoides por parte dos leucócitos depende do número total de leucócitos no ejaculado e do número de leucócitos em relação ao número de espermatozoides.

Comentário 5: Os leucócitos podem prejudicar a motilidade dos espermatozoides e a integridade do DNA através de um ataque oxidativo (ver Seção 4.1). No entanto, para que o nível de infiltração leucocitária observado seja prejudicial depende de fatores impossíveis de inferir a partir de uma amostra de sêmen, tais como a causa, o momento e a localização anatômica da infiltração, bem como a natureza dos leucócitos envolvidos e se eles estão em um estado ativado (Tomlinson et al., 1993; Aitken & Baker, 1995; Rossi & Aitken, 1997).

2.19 Avaliação de células germinativas imaturas no sêmen

As células germinativas incluem espermátides e espermatócitos redondos, mas raramente espermatogônias. Elas podem ser detectadas em esfregaços de sêmen corados, mas podem ser difíceis de distinguir das células inflamatórias quando estão se degenerando.

As espermátides e os espermatócitos geralmente podem ser diferenciados dos leucócitos em um esfregaço de sêmen corado pelo procedimento de Papanicolaou (Johanisson et al., 2000) (ver Seção 2.14.2). A identificação pode basear-se na coloração, tamanho e forma nuclear (ver as Figuras 6, 10, 11, 12, 13 e 14), ausência de peroxidase intracelular (ver Seção 2.18) e ausência de antígenos específicos para leucócitos (ver Seção 3.2). Espermátides multinucleadas podem ser facilmente confundidas morfológicamente com leucócitos polimorfonucleares, mas com uma coloração rósea, em contraste com os leucócitos PMN mais azulados (Johanisson et al., 2000). As espermátides arredondadas podem ser identificadas com colorações específicas para o acrossomo em desenvolvimento (Couture et al., 1976), lectinas (ver Seção 4.4.1) ou anticorpos específicos (Homyk et al., 1990; Ezeh et al., 1998).

O tamanho nuclear também pode ajudar na identificação: As espermatogônias (muito raramente vistas no sêmen) têm um núcleo de aproximadamente 8 μm , os espermatócitos têm um núcleo de aproximadamente 10 μm e as espermátides têm um núcleo de aproximadamente 5 μm . Esses tamanhos são apenas diretrizes, já que a degeneração e a divisão afetam o tamanho do núcleo.

2.20 Teste para revestimento de anticorpos para espermatozoides

Se os espermatozoides mostrarem aglutinação (ou seja, os espermatozoides móveis aderidos um ao outro, cabeça-a-cabeça, cauda-a-cauda ou de uma maneira mista) (ver Seção 2.4.4), a presença de anticorpos espermáticos pode ser a causa.

Comentário 1: Os anticorpos espermáticos podem estar presentes sem aglutinação dos

espermatozoides. Igualmente, a aglutinação pode ser causada por outros fatores diferentes aos anticorpos espermáticos.

Comentário 2: A mera presença de anticorpos espermáticos é insuficiente para o diagnóstico de autoimunidade espermática. É necessário demonstrar que os anticorpos interferem severamente com a função espermática; isso geralmente é feito por um teste de penetração de espermatozoides no muco (ver Seção 3.3). Os anticorpos também podem interferir na ligação em zona e na reação acrossômica.

Anticorpos antiespermatozoides (ASAs) no sêmen pertencem quase exclusivamente a duas classes de imunoglobulinas: IgA e IgG. Anticorpos IgM, devido ao seu tamanho maior, raramente são encontrados no sêmen. Os anticorpos IgA podem ter maior importância clínica do que os anticorpos IgG (Kremer & Jager, 1980). Ambas as classes podem ser detectadas em espermatozoides ou em fluidos biológicos em testes de triagem relacionados.

- Testes para anticorpos em espermatozoides (“testes diretos”). Dois testes diretos são descritos aqui: o teste de reação da antiglobulina mista (MAR) (para revisão, ver Bronson et al., 1984) e o teste imunobiológico (IB) (Bronson et al., 1982; Clarke et al., 1982, 1985). O teste MAR é realizado em uma amostra fresca de sêmen, enquanto o teste IB utiliza espermatozoides lavados. Os resultados dos dois testes nem sempre estão de acordo (MacMillan & Baker, 1987; Scarselli et al., 1987; Meinertz e Bronson, 1988; Hellstrom et al., 1989), mas os resultados do teste IB estão bem correlacionados com os resultados do teste de imobilização que detecta anticorpos no soro. Os protocolos experimentais para os testes IB e MAR variam, mas para ambas, a preparação espermatozoides/esfera é examinada com um microscópio. As esferas aderem-se aos espermatozoides móveis e imóveis que têm anticorpos ligados à superfície; a porcentagem de espermatozoides móveis com esferas aderidas é registrada.
- Testes para anticorpos antiespermatozoides em fluidos sem espermatozoides, ou seja, plasma seminal, soro sanguíneo e muco cervical solubilizado (testes “indiretos”). Nestes testes, o fluido diluído, inativado pelo calor, suspeito de conter ASAs é incubado com espermatozoides de doadores livres de anticorpos que foram lavados de todo o fluido seminal. Qualquer ASA no fluido suspeito se ligará especificamente aos espermatozoides doadores, que são então avaliados em um teste direto, como acima. Para resultados confiáveis, é importante dar tempo suficiente para a interação espermatozoide-anticorpo, pois pode levar até 10 minutos para a aglutinação mista se tornar visível. No entanto, deve-se ter em mente que a motilidade dos espermatozoides diminui com o tempo e os testes dependem da presença de espermatozoides móveis.

Nota 1: Os dois testes ASA descritos aqui estão disponíveis comercialmente. Ambos dependem da presença de espermatozoides móveis. Se houver espermatozoides móveis insuficientes, os testes indiretos em plasma seminal ou em soro sanguíneo podem ser usados.

Nota 2: Anticorpos citotóxicos que matam todos os espermatozoides ou inibem a motilidade dos espermatozoides não podem ser detectados com esses ensaios.

2.20.1 O teste de reação mista de antiglobulina

O teste de reação da antiglobulina mista (MAR) é um teste de rastreamento barato, rápido e sensível (Rajah et al., 1992), mas fornece menos informações do que o teste direto de immunobead (ver Seção 2.20.2).

No teste MAR, um anticorpo “em ponte” (anti-IgG ou anti-IgA) é usado para colocar as esferas revestidas com anticorpo em contato com espermatozoides não lavados em sêmen contendo IgG ou IgA de superfície. Os testes diretos IgG e IgA MAR são realizados misturando sêmen fresco, não tratado separadamente com partículas de látex (esferas) ou glóbulos vermelhos tratados com IgG ou IgA humana. Às suspensões adiciona-se uma anti-IgG humana monoespecífica ou anti-IgA humana. A formação de aglutinados mistos entre partículas e espermatozoides móveis indica a presença de anticorpos IgG ou IgA nos espermatozoides. (Aglutinação entre grânulos serve como um controle positivo para o reconhecimento de antígeno-anticorpo).

2.20.1.1 Procedimento

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Remover alíquotas replicadas de 3,5 µl de sêmen e colocá-las em lâminas de microscópio separadas.
3. Incluir uma lâmina com 3,5 µl de sêmen ASA-positivo e uma com 3,5 µl de sêmen ASA-negativo como controles em cada teste direto. Este sêmen deve ser de homens com e sem anticorpos antiespermatozoides, respectivamente, como mostrado nos testes diretos MAR anteriores. Alternativamente, os espermatozoides positivos podem ser produzidos por incubação em soro conhecido por conter anticorpos (ver Seção 2.20.3).
4. Adicionar 3,5 µl de partículas de látex (esferas) revestidas com IgG a cada gota de sêmen de teste e de controle e misturar agitando com a ponta da pipeta.
5. Adicionar 3,5 µl de antissoro contra IgG humana a cada mistura de esferas/sêmen e misturar agitando com a ponta da pipeta.
6. Cobrir a suspensão com uma lamela (22 mm × 22 mm) para proporcionar uma profundidade de aproximadamente 20 µm (ver Quadro 2.4).
7. Armazenar a lâmina horizontalmente durante 3 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento.
8. Examinar a preparação úmida com óptica de contraste de fase com uma ampliação de × 200 ou × 400 após 3 minutos e novamente após 10 minutos.
9. Repetir o procedimento utilizando esferas revestidas com IgA em vez de IgG e anticorpos anti-IgA em vez de anti-IgG.

2.20.1.2 Pontuação

Se os espermatozoides tiverem anticorpos na sua superfície, as esferas de látex irão aderir a eles. Os espermatozoides móveis inicialmente serão vistos em movimento com algumas ou mesmo um grupo de partículas ligadas. Eventualmente, os aglutinados se tornam tão maciços que o movimento dos espermatozoides será severamente restrito. Os espermatozoides que não possuam anticorpos de revestimento serão vistos nadando livremente entre as partículas.

O objetivo do ensaio é determinar a porcentagem de espermatozoides móveis que têm esferas anexadas a eles. Um problema comum ocorre com os espermatozoides NP que estão próximos das esferas, mas não estão conectados a elas. Muitas vezes pode ser verificado se as esferas estão unidas batendo levemente a lamínula com a ponta de uma pipeta pequena: o movimento dos grânulos em conjunto com os espermatozoides ativos é indicativo de ligação positiva.

1. Contar apenas espermatozoides móveis e determinar a porcentagem de espermatozoides móveis que têm duas ou mais partículas de látex anexadas. Ignorar as ligações na ponta da cauda.
2. Avaliar pelo menos 200 espermatozoides móveis em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
3. Calcular a porcentagem de espermatozoides móveis que tem partículas unidas.
4. Registrar a classe (IgG ou IgA) e o local de ligação das partículas de látex aos espermatozoides (cabeça, peça intermediária, peça principal). Ignorar as ligações na ponta da cauda.

Nota 1: Se 100% dos espermatozoides móveis estiverem ligados às esferas em 3 minutos, tome isso como o resultado do teste; não leia novamente aos 10 minutos.

Nota 2: Se menos de 100% dos espermatozoides móveis estiverem ligados às esferas em 3 minutos, leia a lâmina novamente aos 10 minutos.

Nota 3: Se os espermatozoides estiverem imóveis aos 10 minutos, tome o valor aos 3 minutos como resultado.

2.20.1.3 Valor de referência

Atualmente, não há valores de referência para espermatozoides ligados a anticorpos no teste MAR de sêmen em homens férteis. Enquanto se aguarda por provas adicionais, este manual mantém o valor de consenso de 50% de espermatozoides móveis com partículas aderentes como um valor limiar.

Comentário: A penetração espermática no muco cervical e a fertilização in vivo tendem a estar significativamente prejudicadas quando 50% ou mais dos espermatozoides móveis têm anticorpos ligados a eles (Abshagen et al., 1998). A ligação de partículas restrita à ponta da cauda não está associada à fertilidade diminuída e pode estar presente em homens férteis (Chiu & Chamley, 2004).

2.20.2 Teste direto immunobead (imunoesferas)

Este ensaio é mais demorado do que o teste MAR, mas fornece informações sobre anticorpos em espermatozoides que foram removidos de possíveis componentes mascarados no plasma seminal.

No teste com imunoglobulina direta (IB), as esferas revestidas com imunoglobulinas de coelho anti IgG ou IgA humano ligadas covalentemente são misturadas diretamente com espermatozoides lavados. A ligação das esferas com anti-IgG ou IgA humanos a espermatozoides móveis indica a presença de anticorpos IgG ou IgA na superfície dos espermatozoides.

2.20.2.1 Reagentes

1. Soro fisiológico tamponado com glicose-fosfato de Dulbecco (PBS) - albumina de soro bovino (BSA) ou solução de BSA de Tyrode: consulte o Apêndice 4, seções A4.2 e A4.9.
2. Tampão I: adicionar 0,3 g de fração de Cohn V BSA a 100 ml de PBS de Dulbecco ou meio de Tyrode.
3. Tampão II: adicionar 5 g de fração de Cohn V BSA a 100 ml de PBS de Dulbecco ou meio de Tyrode.
4. Filtrar todas as soluções através de filtros de 0,45 µm e aquecer a 25–35 °C antes de utilizar.

2.20.2.2 Preparando a immunobead

1. Para cada tipo de imunoglobina (IgG, IgA), adicionar 0,2 ml de suspensão de esferas a 10 ml de tampão I em tubos separados de centrifuga.
2. Centrifugar a 500g ou 600g por 5-10 minutos.
3. Decantar e descartar o sobrenadante das immunobeads lavadas.
4. Ressuspender suavemente as esferas em 0,2 ml de tampão II.

2.20.2.3 Preparando os espermatozoides

A quantidade de sêmen necessária para esses ensaios é determinada a partir da concentração e motilidade dos espermatozoides, como mostra a Tabela 2.7.

Tabela 2.7 Quantidade de sêmen a ser utilizado para um teste com imunoesferas

Concentração do espermatozoide (10 ⁶ /ml)	Motilidade do espermatozoide (PR) (%)	Volume de sêmen requerido (ml)
> 50	—	0,2
21–50	> 40	0,4
21–50	< 40 > 10	0,8
10–20	> 40	1,0
10–20	< 40 > 10	2,0
< 10 > 5	> 10	> 2,0

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Transferir a quantidade necessária de sêmen para um tubo de centrifuga e fazer 10 ml com tampão I.
3. Centrifugar a 500g por 5–10 minutos.
4. Decantar e descartar o sobrenadante dos espermatozoides lavados.
5. Ressuspender suavemente o sedimento de espermatozoides em 10 ml de tampão I fresco.

6. Centrifugar novamente a 500g por 5–10 minutos.
7. Decantar e descartar o sobrenadante.
8. Ressuspender suavemente o sedimento de espermatozoides em 0,2 ml de tampão II.

Nota 1: Alíquotas de mais de 1,0 ml requerem três lavagens.

Nota 2: Amostras com baixa motilidade espermática (por exemplo, 10% ou menos) podem não fornecer resultados claros. Neste caso, considere o teste de immunobead indireto (ver Seção 2.20.3).

2.20.2.4 Procedimento

Espermatozoides ASA positivos e espermatozoides ASA negativos devem ser incluídos como controles em cada teste. O sêmen deve ser de homens com e sem anticorpos antiespermatozoides, respectivamente, conforme detectado em testes diretos com immunobead.

1. Colocar 5 µl da suspensão de esperma lavado a ser testada numa lâmina de microscópio.
2. Preparar lâminas separadas com 5 µl de espermatozoides ASA positivos e 5 µl de espermatozoides ASA negativos.
3. Adicionar 5 µl de suspensão de imunoglobulina anti-IgG ao lado de cada gota de esperma.
4. Misturar cada imunoglobulina anti-IgG e as gotículas de esperma juntos, mexendo com a ponta da pipeta.
5. Colocar uma lamela de 22 mm x 22 mm sobre a gota misturada para fornecer uma profundidade de aproximadamente 20 µm (ver Quadro 2.4).
6. Armazenar as lâminas horizontalmente durante 3–10 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta). Não espere mais do que 10 minutos antes de avaliar as lâminas, pois a ligação das esferas diminui significativamente durante a incubação (Gould et al., 1994).
7. Examinar as lâminas com ótica de contraste de fase com ampliação de × 200 ou × 400.
8. Pontuar apenas espermatozoides móveis que tenham uma ou mais esferas ligadas, conforme descrito na Seção 2.20.1.2. Ignore as ligações na ponta da cauda.
9. Interpretar o teste conforme descrito na Seção 2.20.1.3.
10. Repetir o procedimento usando a suspensão immunobead anti-IgA.

Nota: Para garantir que todas as ligações sejam avaliadas em 10 minutos, é melhor escalonar a preparação das lâminas.

2.20.2.5 Valor de referência

Atualmente, não há valores de referência para espermatozoides ligados a anticorpos no teste IB no sêmen de homens férteis. Enquanto se aguarda por provas adicionais, este manual mantém o valor de consenso de 50% de espermatozoides móveis com partículas aderentes como um valor limiar.

Comentário: O diagnóstico de infertilidade imunológica é feito quando 50% ou mais dos espermatozoides móveis (progressivos e não progressivos) têm partículas aderentes (Barratt et al., 1992). A ligação de partículas restrita à ponta da cauda não está associada à fertilidade diminuída e pode estar presente em homens férteis (Chiu & Chamley, 2004).

2.20.3 Teste indireto immunobead (imunoesferas)

O teste de immunobead indireto é usado para detectar anticorpos antiespermatozoides em fluidos sem espermatozoide ativados por calor (soro, fluido testicular, plasma seminal ou muco cervical solubilizado com bromelaína). Os espermatozoides livres de anticorpos dos doadores absorvem os anticorpos antiesperma presentes no fluido testado e são então avaliados como no teste immunobead direto.

2.20.3.1 Reagentes

Veja a Seção 2.20.2.1 (reagentes para o teste IB direto).

Se o muco cervical for testado, preparar 10 UI/ml de bromelaína, uma enzima proteolítica de especificidade ampla (EC 3.4.22.32) (ver Quadro 2.2).

2.20.3.2 Preparando a immunobead

Consulte a Seção 2.20.2.2.

2.20.3.3 Preparando os espermatozoides do doador

Consulte a Seção 2.20.2.3.

2.20.3.4 Preparando o fluido a ser testado

1. Se testar o muco cervical, diluir 1 + 1 (1: 2) com 10 UI/ml de bromelaína, agitar com a ponta de uma pipeta e incubar a 37 °C durante 10 minutos. Quando a liquefação estiver completa, centrifugar a 2000g por 10 minutos. Usar o sobrenadante imediatamente para o teste ou congelar a -70 °C.
2. Inativar qualquer complemento no muco cervical solubilizado, soro, plasma seminal ou fluido testicular por aquecimento a 56 °C por 30 a 45 minutos.
3. Diluir a amostra inativada pelo calor 1 + 4 (1: 5) com tampão II (por exemplo, 10 µl do fluido corporal a ser testado com 40 µl de tampão II).

4. Incluir amostras conhecidas positivas e negativas, por ex. soro de homens com e sem anticorpos antiespermatozoides, respectivamente, como detectado no teste de immunobead indireto, como controles em cada teste indireto. Os homens que fizeram uma vasectomia podem ser uma fonte de soro se positivos (> 50% de espermatozoides móveis com ligação a cordão, excluindo a ligação na ponta da cauda).

2.20.3.5 Incubar os espermatozoides do doador com o fluido a ser testado

1. Misturar 50 µl de suspensão de esperma lavado do doador com 50 µl de fluido a ser testado, diluído 1 + 4 (1: 5).
2. Incubar a 37 °C por 1 hora.
3. Centrifugar a 500g por 5–10 minutos.
4. Decantar e descartar o sobrenadante.
5. Ressuspender suavemente o sedimento de espermatozoides em 10 ml de tampão I fresco.
6. Centrifugar novamente a 500g por 5–10 minutos.
7. Decantar e descartar o sobrenadante.
8. Repetir os passos de lavagem 5, 6 e 7 acima.
9. Ressuspender suavemente o sedimento de espermatozoides em 0,2 ml de tampão II.

2.20.3.6 Teste immunobead

1. Realizar o teste IB, conforme descrito na Seção 2.20.2.4, com os espermatozoides incubados do doador.
2. Marcar e interpretar o teste conforme descrito nas Seções 2.20.1.2 e 2.20.1.3.

CAPÍTULO 3 Procedimentos Opcionais

Os testes descritos neste capítulo não são necessários para a análise de rotina do sêmen, mas podem ser úteis em certas circunstâncias para fins de diagnóstico ou pesquisa.

3.1 Índices de múltiplos defeitos espermáticos

Os espermatozoides morfológicamente anormais frequentemente apresentam múltiplos defeitos (na cabeça, peça intermediária ou principal, ou combinações desses defeitos). Uma avaliação detalhada da incidência de anormalidades morfológicas pode ser mais útil do que uma simples avaliação da porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, especialmente em estudos da extensão do dano à espermatogênese humana (Jouannet et al., 1988; Auger et al., 2001). O registro dos espermatozoides morfológicamente normais, bem como aqueles com anormalidades da cabeça, peça intermediária e peça principal, em um sistema de entradas múltiplas, fornece o número médio de anormalidades por espermatozoide avaliado.

Três índices podem ser derivados de registros das anormalidades detalhadas da cabeça, da peça intermediária e da peça principal em um sistema de entradas múltiplas:

- O índice de múltiplas anomalias (MAI) (Jouannet et al., 1988);
- O índice de teratozoospermia (TZI) (Menkveld & Kruger, 1996; Menkveld et al., 2001);
- O índice de deformidade espermática (SDI) (Aziz et al., 1996, 2004).

Esses índices foram correlacionados com a fertilidade in vivo (MAI e TZI) (Jouannet et al., 1988; Menkveld et al., 2001; Slama et al., 2002) e in vitro (SDI) (Aziz et al., 1996) e podem ser úteis em avaliações de certas exposições ou condições patológicas (Auger et al., 2001; Aziz et al., 2004).

3.1.1 Cálculo de índices de múltiplos defeitos morfológicos

Cada espermatozoide anormal é pontuado por defeitos da cabeça, peça intermediária e peça principal, e pela presença de excesso de citoplasma residual (volume de mais de um terço do tamanho da cabeça do espermatozoide). Podem ser usados contadores de células de laboratório, com o número de teclas de entrada adaptadas ao tipo de índice que está sendo avaliado. Se um contador não estiver disponível, uma planilha simples pode ser usada.

- O MAI é o número médio de anomalias por espermatozoide anormal. Todas as anomalias da cabeça, da peça intermediária e da peça principal estão incluídas no cálculo. Os critérios morfológicos utilizados para esta análise são de David et al. (1975), modificados por Auger & Eustache (2000), e diferem daqueles apresentados neste manual (Seções 2.15.1 e 2.15.2).
- O TZI é semelhante ao MAI, mas um máximo de quatro defeitos por espermatozoide anormal é contado: um para cabeça, peça intermediária e peça principal e um para excesso de citoplasma residual, qualquer que seja o número real de anomalias por espermatozoide anormal. Os critérios morfológicos dados neste manual podem ser usados.

- O SDI é o número de defeitos dividido pelo número total de espermatozoides (não apenas os espermatozoides anormais). Incorpora várias categorias de anomalia na cabeça, mas apenas uma para cada defeito da peça intermediária e principal. Os critérios morfológicos dados neste manual podem ser usados.

Tabela 3.1 Cálculo de índices de múltiplos defeitos espermáticos

	MAI	TZI*	SDI
Valor máximo		4,00	3,00
Denominador	Esperma anormal	Esperma anormal	Esperma total
(A) N° de espermatozoides contados	200	200	200
Espermatozoides normais (N)	46	46	46
Espermatozoides normais (%)	23	23	23
(B) N° de espermatozoides com defeitos (200–46)	154	154	154
(1) N° de defeitos na cabeça (MAI, SDI) ou número de espermatozoides com 1 defeito na cabeça ou mais (TZI)	284	154	212
(2) N° de defeitos da peça intermediária (MAI) ou número de espermatozoides com 1 defeito na peça intermediária ou mais (TZI, SDI)	54	52	52
(3) N° de defeitos da peça principal (MAI) ou número de espermatozoides com 1 defeito na peça principal ou mais (TZI, SDI)	54	46	46
(4) N° de espermatozoides com excesso de citoplasma residual	14	14	14
(C) Defeitos totais MAI: (1) + (2) + (3) = (C)	392		
(D) Defeitos totais TZI, SDI: (1) + (2) + (3) + (4) = (D)		266	324
Cálculo do índice	C/B	D/B	D/A
Valor do índice	2,55	1,72	1,62

* Esta descrição da TZI está de acordo com o artigo original (Menkveld et al., 2001) e o manual da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e da Associação Nórdica de Andrologia (NAFA) (ESHRE/NAFA, 2002), que fornecem valores que variam de 1 a 4. Isto é diferente da descrição na edição anterior deste manual (OMS, 1999), na qual o excesso de citoplasma residual foi considerado um defeito intermediário e que deu valores de TZI variando de 1 a 3.

3.1.2. Exemplo prático

Exemplo. De 200 espermatozoides marcados com um contador diferencial de seis teclas para o replicado 1, 42 são classificados como normais e 158 como anormais. Dos 158 espermatozoides anormais, 140 tinham defeitos na cabeça, 102 tinham defeitos na peça do meio, 30 tinham defeitos na peça principal e 44 tinham excesso de citoplasma residual. Os resultados da réplica 2 foram: 36 normais e 164 anormais, dos quais 122 tinham defeitos na cabeça, 108 tinham defeitos na peça intermediária, 22 tinham defeitos na peça principal e 36 tinham citoplasmas residuais em excesso. Para determinar o TZI, divida o número total de defeitos determinados ($140 + 102 + 30 + 44 + 122 + 108 + 22 + 36 = 604$ anormalidades) pelo número de espermatozoides anormais ($158 + 164 = 322$), ou seja, $TZI = 604/322 = 1,88$.

A Tabela 3.2 apresenta valores para MAI e TZI para homens que frequentam clínicas de infertilidade e homens que tiveram filhos nos últimos 3 anos.

Tabela 3.2 Índice de defeitos espermáticos para homens de casais férteis e inférteis

	Casais inférteis		Casais férteis	
	MAI ¹	TZI ²	MAI ³	TZI ²
Média	1,94	1,81	1,58	1,51
DP	0,37	0,3	0,2	0,2
Mínima	1,12	1,26	1,04	1,17
Máxima	3,9	2,64	2,38	2,07
Percentis				
5	1,44		1,27	
10	1,51	1,74	1,34	1,33
25	1,67		1,44	
50	1,88	1,81	1,58	1,54
75	2,14		1,72	
90	2,44		1,86	
95	2,65		1,94	
N	4930	103	994	107

¹ Dados não publicados de J Auger, Paris, usando a classificação morfológica de David (David et al., 1975, modificado por Auger & Eustache, 2000).

² Menkveld et al., 2001.

³ Jørgensen et al., 2001, usando a classificação morfológica de David (David et al., 1975; modificado por Auger & Eustache, 2000).

3.2 Coloração imunocitoquímica de pan-leucócitos (CD45)

Os leucócitos polimorfonucleares que liberaram seus grânulos e outras espécies de leucócitos, como linfócitos, macrófagos ou monócitos, que não contêm peroxidase, não podem ser detectados pelo teste da o-toluidina para a peroxidase celular (ver Seção 2.18.1), mas podem ser detectados por meios imunocitoquímicos. A coloração imunocitoquímica é mais cara e demorada do que a avaliação da atividade da peroxidase, mas é útil para distinguir entre leucócitos e células germinativas.

3.2.1 Princípio

Todas as classes de leucócitos humanos expressam um antígeno específico (CD45) que pode ser detectado com um anticorpo monoclonal apropriado. Ao alterar a natureza do anticorpo primário, esse procedimento geral pode ser adaptado para permitir a detecção de diferentes tipos de leucócitos, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células B ou células T, caso sejam o foco de interesse.

3.2.2 Reagentes

1. Soro fisiológico tamponado com glicose-fosfato de Dulbecco (DPBS): consulte o Apêndice 4, seção A4.2.
2. Solução salina Tris-tamponada (TBS), pH 8.2; ver o Apêndice 4, seção A4.8.

3. Tetramisol-HCl (levamisol) 1,0 mol/l: dissolver 2,4 g de levamisol em 10 ml de água purificada.
4. Substrato: para 9,7 ml de TBS (pH 8,2) adicionar 2 mg de naftol AS-MX fosfato, 0,2 ml de dimetilformamida e 0,1 ml de 1,0 mol/l de levamisol. Pouco antes do uso, adicionar 10 mg de sal e filtro Fast Red TR (tamanho de poro de 0,45 μ m).
5. Fixador: apenas acetona ou acetona/metanol/formaldeído: para 95 ml de acetona, adicionar 95 ml de metanol absoluto e 10 ml de formaldeído a 37% (v/v).
6. Anticorpo primário: um anticorpo monoclonal de camundongo contra o antígeno leucocitário comum, codificado CD45.
7. Anticorpo secundário: anti-imunoglobulinas de coelho camundongo. A diluição utilizada dependerá do título e fonte de anticorpos.
8. Complexo de fosfatase alcalina-fosfatase antialcalina (APAAP).
9. Mistura de coloração de hematoxilina de Harris (como contracoloração): consulte o Apêndice 4, seção A4.10.

3.2.3 Procedimento

3.2.3.1 Preparando o sêmen

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Misturar uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml com cinco volumes de DPBS.
3. Centrifugar a 500g por 5 minutos, remover o sobrenadante e suspender o sedimento de esperma em cinco vezes o volume de DPBS.
4. Centrifugar a 500g por 5 minutos.
5. Repetir este procedimento mais uma vez e ressuspender o sedimento em DPBS para aproximadamente 50×10^6 espermatozoides por ml.

3.2.3.2 Preparando os esfregaços de esperma

1. Fazer esfregaços replicados em lâminas de vidro limpas (consulte a Seção 2.13.2) a partir de alíquotas de 5 μ l da suspensão e deixá-las secar ao ar livre.
2. Fixar as células secas ao ar em acetona absoluta por 10 minutos ou em acetona/etanol/formaldeído por 90 segundos.
3. Lavar as lâminas duas vezes com TBS e permitir que drenem.
4. As lâminas podem então ser coradas imediatamente ou embrulhadas em papel alumínio e armazenadas a -70°C para posterior análise.

3.2.3.3 Incubação com anticorpos

1. Em cada lâmina, marcar uma área de células fixas (um círculo de cerca de 1 cm de diâmetro) com um lápis de graxa (caneta delimitadora) e cobrir a área com 10 µl de anticorpo monoclonal primário.
2. Armazenar a lâmina horizontalmente durante 30 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento.
3. Lavar as lâminas duas vezes com TBS e permitir que drenem.
4. Cobrir a mesma área do esfregaço com 10 µl de anticorpo secundário e incubar por 30 minutos em uma câmara úmida à temperatura ambiente.
5. Lavar as lâminas duas vezes com TBS e permitir que drenem.
6. Adicionar 10 µl de APAAP à mesma área.
7. Incubar por 1 hora em uma câmara úmida à temperatura ambiente.
8. Lavar as lâminas duas vezes em TBS e permitir que drenem.
9. Incubar com 10 µl de substrato de fosfato de naftol por 20 minutos em uma câmara úmida à temperatura ambiente.

Nota: A fim de intensificar o produto da reação, a coloração com o anticorpo secundário e APAAP pode ser repetida, com um período de incubação de 15 minutos para cada reagente.

3.2.3.4 Contracoloração e montagem

1. Depois que as lâminas tiverem desenvolvido uma cor avermelhada, lavar com TBS.
2. Realizar a contracoloração por alguns segundos com hematoxilina; lavar em água corrente e montar num meio de montagem aquoso (ver Seções 2.14.2.4 e 2.14.2.5).

3.2.3.5 Avaliando os números de células CD45-positivas

1. Examinar toda a área manchada da lâmina com óptica de campo claro com ampliação de $\times 200$ ou $\times 400$. As células positivas para CD45 (leucócitos) estarão coradas de vermelho (ver Fig. 3.1).
2. Classificar separadamente as células positivas para CD45 e os espermatozoides até que pelo menos 200 espermatozoides tenham sido observados em cada réplica, a fim de alcançar um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.7 e Tabela 2.2).
3. Registrar o número de células positivas para CD45 e espermatozoides com auxílio de um contador de laboratório.
4. Avaliar o segundo esfregaço da mesma maneira (até que 200 espermatozoides tenham sido contados).
5. Calcular a soma e a diferença das duas contagens de células positivas para CD45.

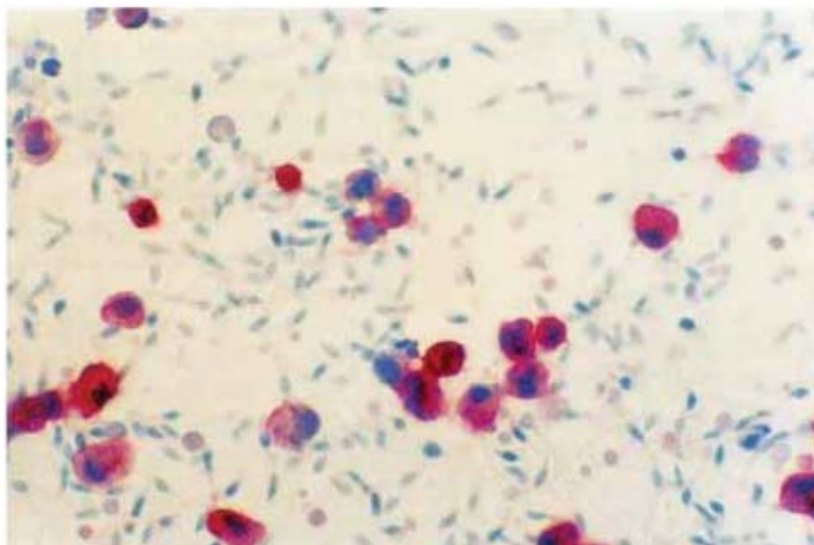
6. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.5 ou da Figura A7.1, Apêndice 7. (Cada um mostra a diferença máxima entre as duas contagens que se espera que ocorram em 95% das amostras por causa do erro de amostragem isolado).
7. Se a diferença for aceitável, calcular a concentração (veja a Seção 3.2.3.6). Se a diferença for muito alta, reavaliar as lâminas da réplica (ver Quadro 2.10).
8. Relatar a concentração média de células positivas para CD45 em dois algarismos significativos.
9. Calcular o número total de células positivas para CD45 por ejaculação (ver Comentário após a Seção 3.2.3.9).

3.2.3.6 Cálculo da concentração de células positivas para CD45 no sêmen

A concentração de células positivas para CD45 é calculada em relação à dos espermatozoides na lâmina. Se N é o número de células positivas para CD45 contadas no mesmo número de campos que 400 espermatozoides e S é a concentração de espermatozoides (10^6 por ml), então a concentração (C) de células positivas para CD45 (10^6 por ml) pode ser calculada a partir da fórmula $C = S \times (N/400)$.

Fig. 3.1 Leucócitos no sêmen

As células portadoras de CD45 (leucócitos) estão coradas de vermelho.



Micrografia cortesia de RJ Aitken.

3.2.3.7 Sensibilidade do método

Se houver menos células positivas para CD45 do que espermatozoides na amostra (ou seja, <400), o erro de amostragem excederá 5%. Nesse caso, relate o erro de amostragem para o número de células contadas (consulte a Tabela 2.2).

Se menos de 25 células positivas para CD45 forem contadas, relate o número de células CD45 positivas observadas com o comentário "Muito poucas para uma determinação precisa da concentração".

3.2.3.8 Exemplos práticos

Exemplo 1. Na réplica 1 existem 20 células positivas para CD45 por 200 espermatozoides, enquanto na réplica 2 existem 40 células positivas para CD45 por 200 espermatozoides. A soma dos valores (20 + 40) é 60 e a diferença (40-20) é 20. A partir da Tabela 2.5, isso é visto como excedendo a diferença esperada apenas pelo acaso (15), então os resultados serão descartados e duas novas avaliações serão feitas.

Exemplo 2. Na réplica 1 existem 25 células positivas para CD45 por 200 espermatozoides e na réplica 2 existem 35 células positivas para CD45 por 200 espermatozoides. A soma dos valores (25 + 35) é 60 e a diferença (35-25) é 10. Na Tabela 2.5, isso é visto como sendo menor do que o encontrado apenas pelo acaso (15), portanto os valores são aceitos.

Para 60 células positivas para CD45 por 400 espermatozoides e uma concentração de espermatozoides de 70×10^6 células por ml, a concentração de células positivas para CD45 é $C = S \times (N/400)$ células por ml = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ células por ml, ou 10×10^6 células por ml (a dois algarismos significativos). Como menos de 400 células foram contadas, relatar o erro de amostragem para 60 células indicadas na Tabela 2.2 (aproximadamente 13%).

3.2.3.9 Valor de referência

Atualmente não existem valores de referência para células positivas para CD45 no sêmen de homens férteis. O valor limite de consenso de $1,0 \times 10^6$ células por ml para células positivas para peroxidase (ver Seção 2.18.1.8) implica uma concentração maior de leucócitos totais, uma vez que nem todos os leucócitos são granulócitos positivos para peroxidase.

Comentário: O número total de leucócitos (número total de leucócitos no ejaculado) pode refletir a gravidade de uma condição inflamatória (Wolff, 1995). O número total de células positivas para CD45 no ejaculado é obtido multiplicando a concentração de células positivas para CD45 pelo volume total do ejaculado.

3.3 Interação entre espermatozoides e muco cervical

O muco cervical é receptivo aos espermatozoides por um tempo limitado durante o ciclo menstrual (no meio do ciclo), quando o muco influenciado pelo estrogênio favorece a penetração dos espermatozoides. O período de tempo durante o qual os espermatozoides podem penetrar o muco cervical varia consideravelmente entre as mulheres e pode variar na mesma mulher de um ciclo para outro.

Nota: Veja o Anexo 5 para obter detalhes sobre a coleta, armazenamento e avaliação das características do muco cervical.

Comentário: Quando um homem não puder fornecer uma amostra de sêmen, o teste pós-coito (ver Seção 3.3.1) pode fornecer algumas informações sobre seus espermatozoides.

3.3.1 Teste in vivo (pós-coital)

3.3.1.1 Propósito

Os objetivos de um teste pós-coital são determinar o número de espermatozoides ativos no muco cervical e avaliar a sobrevivência espermática (Sobrero & MacLeod, 1962) e o comportamento espermático algumas horas após o coito (o papel reservatório do muco) (Moghissi, 1976). Esta informação pode ser usada para avaliar a significância de um teste positivo de anticorpos espermáticos no parceiro masculino ou feminino.

3.3.1.2 Tempo

Os testes pós-coito devem ser realizados o mais próximo possível, mas antes, do tempo de ovulação, conforme determinado pelos critérios clínicos, como por exemplo, duração do ciclo usual, temperatura basal do corpo, alterações do muco cervical, citologia vaginal, hormônio luteinizante, ou estrogênio, urinário, ou sérico, e exame ultrassonográfico ovariano. É importante que o muco seja avaliado em laboratório dentro de um horário padrão - entre 9 e 14 horas após o coito.

3.3.1.3 Instruções para casais

Para a preparação do teste pós-coito, os casais devem ser informados sobre o dia mais adequado para o teste e devem ser instruídos para:

1. abster-se de relações sexuais, e o homem da masturbação, durante 2 dias antes do teste;
2. ter relações sexuais vaginais na noite anterior à data do teste;
3. não usar lubrificantes vaginais durante a relação sexual e a mulher não deve usar duchas vaginais após o coito (é permitido tomar banho, mas não tomar banho completo);
4. a mulher deve se apresentar na clínica para o teste na manhã seguinte.

3.3.1.4 Procedimento

1. Inserir um espécule não lubrificado na vagina.
2. Com uma seringa de tuberculina (sem agulha), pipeta ou tubo de polietileno, aspirar o máximo possível do fluido seminal no fórnix vaginal posterior.
3. Com uma seringa ou cateter diferente, aspirar tanto muco quanto possível do canal endocervical.
4. Colocar a amostra de muco em uma lâmina e aplainar aplicando uma lamela (22 mm × 22 mm). A profundidade desta preparação pode ser padronizada apoiando a laminula com graxa de silicone ou uma mistura de cera com vaselina (ver Quadro 3.1) contendo esferas de vidro de 100 µm de diâmetro (Drobnis et al., 1988).
5. Examinar a preparação com óptica de contraste de fase na ampliação × 400.

Nota: Para resultados confiáveis, é crucial que a amostra de muco seja de boa qualidade e livre de contaminantes sanguíneos.

Quadro 3.1 Preparação da mistura de cera com vaselina

Preparar a mistura de cera com vaselina com tempo. Pode ser armazenada a temperatura ambiente até estar pronta para uso. Derreter a cera (ponto de fusão de 48-66 °C) num bêquer e misturá-la com vaselina (aproximadamente uma parte de cera para duas partes de vaselina) com uma vareta de vidro. Quando a mistura estiver homogênea, deixar esfriar um pouco. Enquanto ainda estiver quente, colocá-la em uma seringa de 3 ou 5 ml (sem agulha). Uma vez que a mistura tenha solidificado, carregar a seringa com uma agulha de calibre 18.

3.3.1.5 A amostra do pool de sêmen vaginal

Os espermatozoides estão geralmente mortos na vagina dentro das primeiras 2 horas. Examinar uma preparação úmida da amostra do pool vaginal (ver Seção 2.4.2) para garantir que o sêmen foi depositado na vagina.

3.3.1.6 A amostra de muco cervical

O número de espermatozoides na parte inferior do canal cervical depende do tempo decorrido desde a relação sexual. Cerca de 2 a 3 horas após o coito, há um grande acúmulo de espermatozoides na parte inferior do canal cervical.

A estimativa do número de espermatozoides no muco cervical está tradicionalmente baseada no número contado por campo no microscópio de alta potência (ver Quadro 3.2). A concentração de espermatozoides no muco deve ser expressa como número de espermatozoides por μl .

Quadro 3.2 Volume observado por campo de alta potência em uma preparação de muco com 100 μm de profundidade

O volume de muco em cada campo microscópico depende da área do campo (πr^2 , onde π é aproximadamente 3,142 e r é o raio do campo microscópico) e da profundidade da câmara (aqui 100 μm). O diâmetro do campo microscópico pode ser medido com um micrômetro ou pode ser estimado dividindo o diâmetro da abertura da lente ocular pela ampliação da lente objetiva.

Com uma objetiva de 40 \times e uma ocular de 10 \times de abertura de 20 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 500 μm (20 mm/40). Neste caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e o volume é 19.637.500 μm^3 ou cerca de 20 nl.

Assim, uma contagem de 10 espermatozoides por $\times 400$ HPF em uma preparação de 100 μm de profundidade é equivalente a aproximadamente 10 espermatozoides por 20 nl de muco ou 500 espermatozoides por μl . No entanto, como o número total de células contadas é baixo, o erro de amostragem é alto. Relate o erro de amostragem para 10 células apresentadas na Tabela 2.2 (aproximadamente 32%).

A motilidade espermática no muco cervical é classificada da seguinte forma:

- PR = motilidade progressiva;
- NP = motilidade não progressiva;
- IM = espermatozoides imóveis.

O indicador mais importante da função cervical normal é a presença de qualquer espermatozoide com motilidade progressiva.

3.3.1.7 Interpretação

- O teste é negativo se não forem encontrados espermatozoides no muco.
- A presença de qualquer espermatozoide com motilidade progressiva no muco endocervical 9–14 horas após o coito, argumenta contra fatores cervicais significativos e autoimunidade espermática, no homem ou na mulher, como possíveis causas de infertilidade (Oei et al., 1995).
- Quando se observam espermatozoides NP exibindo um fenômeno de agitação, pode haver anticorpos espermáticos no muco ou nos espermatozoides.

Nota: Se o resultado inicial for negativo ou anormal, o teste pós-coito deve ser repetido.

Comentário 1: Se nenhum espermatozoide for encontrado na amostra do pool vaginal, o casal deve confirmar se a ejaculação intravaginal aconteceu.

Comentário 2: Um teste negativo pode ser devido a um tempo incorreto. Um teste realizado muito cedo ou muito tarde no ciclo menstrual pode ser negativo em uma mulher fértil. Em algumas mulheres, o teste pode ser positivo por apenas 1 ou 2 dias durante todo o ciclo menstrual. Quando a ovulação não pode ser prevista com um grau razoável de precisão, pode ser necessário repetir o teste pós-coito várias vezes durante um ciclo ou realizar testes repetidos in vitro.

Comentário 3: Testes pós-coito negativos repetidos em ciclos com tempo ideal são necessários para estabelecer fatores cervicais como uma possível causa de infertilidade.

3.3.2 Testes in vitro

Uma avaliação detalhada da interação muco-espermatozoide pode ser realizada usando testes de penetração in vitro. Esses testes geralmente são realizados após um teste pós-coito negativo e são mais informativos quando realizados com testes cruzados usando sêmen de doador e muco cervical de doador como controles. Eles também podem ser usados para avaliar a significância de um teste positivo de anticorpos espermáticos no parceiro masculino ou feminino.

- Quando o objetivo do teste de interação espermatozoide-muco é comparar a qualidade de vários espécimes de muco cervical, deve-se usar uma única amostra de sêmen normozoospermico.
- Quando o propósito é avaliar a qualidade de vários espécimes de sêmen, deve ser usada a mesma amostra de muco cervical de boa qualidade, obtida durante metade do ciclo.

Nota: Veja o Anexo 5 para obter detalhes sobre a coleta, armazenamento e avaliação das características do muco cervical.

Comentário 1: O muco cervical do doador pode ser obtido durante o tempo fértil do ciclo de mulheres que estão programadas para inseminação artificial ou recuperação de oócitos para reprodução assistida. O muco cervical deve ser coletado antes da inseminação, em ciclos naturais ou em ciclos nos quais a ovulação tenha sido induzida através de um tratamento com gonadotrofinas.

Comentário 2: As mulheres podem receber etinilestradiol por 7-10 dias para produzir muco estrogenizado para o teste (ver Apêndice 5, seção A5. 2.1).

Comentário 3: As mulheres que estão recebendo clomifeno para indução da ovulação não devem ser usadas como doadoras de muco cervical, devido aos possíveis efeitos desse estrogênio no colo do útero.

- Deve ser usado muco cervical humano obtido durante a metade do ciclo.

- Testes in vitro devem ser feitos dentro de 1 hora após a coleta do sêmen para prevenir a desidratação ou mudanças na temperatura que afetem a qualidade do sêmen.
- O pH do muco do canal endocervical deve ser medido com papel de pH, variando de 6,0 a 10,0, in situ ou imediatamente após a coleta. Se o pH for medido in situ, deve-se tomar cuidado para medi-lo corretamente, uma vez que o pH do muco exocervical é sempre menor que o do muco no canal endocervical. Cuidados também devem ser tomados para evitar a contaminação com secreções vaginais, que têm um pH baixo.
- Os espermatozoides são suscetíveis a alterações no pH do muco cervical. O muco ácido imobiliza os espermatozoides, enquanto o muco alcalino pode aumentar a motilidade. A alcalinidade excessiva do muco cervical (pH > 8,5) pode afetar adversamente a viabilidade dos espermatozoides. O valor ideal de pH para a migração de espermatozoides e sua sobrevivência no muco cervical é entre 7,0 e 8,5, a faixa de pH do muco cervical normal da metade do ciclo. Enquanto um valor de pH entre 6,0 e 7,0 pode ser compatível com a penetração espermática, a motilidade é frequentemente prejudicada abaixo de pH 6,5 e os testes de espermatozoides com muco cervical geralmente não são realizados se o pH do muco for menor do que 7,0.

Nota: Géis substitutos, como muco cervical bovino ou géis sintéticos, não podem ser considerados como equivalentes ao muco cervical humano para testes in vitro de interação muco-espermatozoide. No entanto, o uso desses materiais fornece informações sobre a motilidade dos espermatozoides dentro de meios viscosos (Neuwinger et al., 1991; Ivic et al., 2002).

3.3.3 Teste de lâmina simplificado in vitro

3.3.3.1 Procedimento

1. Colocar uma gota de muco cervical em uma lâmina e alisá-lo aplicando uma lamínula (22 mm × 22 mm). A profundidade desta preparação pode ser padronizada apoiando a lamínula com graxa de silicone ou uma mistura de cera com vaselina (ver Quadro 3.1) contendo esferas de vidro de 100 µm de diâmetro (Drobnis et al., 1988).
2. Depositar uma gota de sêmen a cada lado da lamínula e em contato com sua borda, de modo que o sêmen se movimente sob a lamela por forças capilares. Desta forma, interfaces claras são obtidas entre o muco cervical e o sêmen.
3. Armazenar a lâmina horizontalmente durante 30 minutos a 37 °C em uma câmara úmida (por exemplo, em um papel de filtro saturado com água em uma placa de Petri coberta) para evitar o ressecamento.
4. Examinar a interface com óptica de contraste de fase com ampliação de 400 ×.

3.3.3.2 Observações

Observe se as seguintes características estão presentes:

1. Em poucos minutos, projeções semelhantes a dedos (falanges) do líquido seminal se desenvolvem e penetram no muco. Esta é uma propriedade física

dos fluidos e pode acontecer mesmo em amostras azoospérmicas (Perloff & Steinberger, 1963; Moghissi et al., 1964).

2. A maioria dos espermatozoides penetra no canal da falange antes de entrar no muco. Em muitos casos, um único espermatozoide parece levar uma coluna de espermatozoides ao muco.
3. Uma vez no muco cervical, os espermatozoides se espalham e parecem se mover aleatoriamente. Alguns retornam ao plasma seminal, mas a maioria migra profundamente para dentro do muco cervical até encontrar resistência por restos celulares ou leucócitos.
4. Os espermatozoides progridem no muco por 500 μm (isto é, cerca de 10 comprimentos de esperma) da interface sêmen-muco ou mais.
5. Os espermatozoides são móveis (observe a porcentagem aproximada de espermatozoides móveis e se eles têm motilidade progressiva).

3.3.3.3 Interpretação

A interpretação do teste de lâmina simplificado é subjetiva, porque é impossível padronizar o tamanho e a forma da interface sêmen-muco em uma preparação de lâmina simples. Consequentemente, fornece apenas uma avaliação qualitativa da interação entre espermatozoide e muco. No entanto, várias observações úteis podem ser feitas.

1. Resultado normal: os espermatozoides penetram na fase do muco e mais de 90% são móveis com progressão definida. Isso sugere que não há problema com a interação muco-espermatozoide.
2. Resultado pobre: os espermatozoides penetram na fase do muco, mas a maioria não progride mais do que 500 μm (isto é, cerca de 10 comprimentos de espermatozoide) na interface sêmen-muco. Isso sugere que há problema com a interação muco-espermatozoide.
3. Resultado anormal: ou: (1) os espermatozoides penetram na fase do muco, mas rapidamente se tornam imóveis ou mostram um movimento de "agitação", ou (2) os espermatozoides não penetram na interface sêmen-muco. As falanges podem ou não ser formadas, mas os espermatozoides se congregam ao longo do lado do sêmen da interface. Isto sugere a presença de anticorpos antiespermatozoides no muco ou na superfície dos espermatozoides.

Comentário: Quando se obtém um resultado anormal usando amostras de sêmen e muco do casal, o teste cruzado usando sêmen doador e muco cervical do doador pode identificar se o sêmen ou o muco cervical é responsável pelo resultado anormal.

3.3.4 Teste de tubo capilar

O teste do tubo capilar foi originalmente desenhado por Kremer (1965) e várias modificações já foram propostas. O teste mede a capacidade dos espermatozoides de penetrar uma coluna de muco cervical em um tubo capilar. O procedimento recomendado aqui é baseado no teste original.

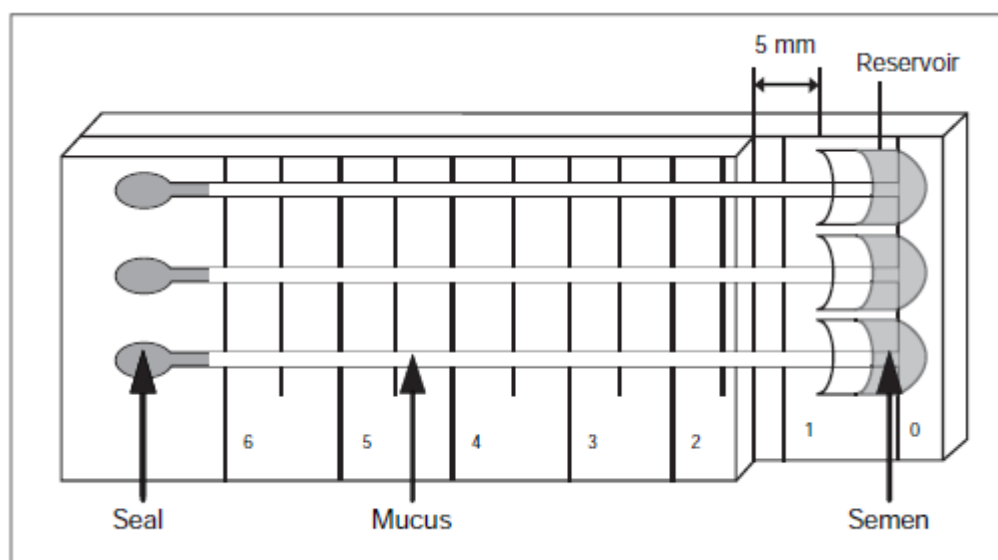
3.3.4.1 Equipamento

Vários tipos de tubo capilar foram utilizados, mas tubos capilares planos, com 5 cm de comprimento e com um percurso de visualização de 0,3 mm de diâmetro interno, são recomendados.

Um medidor de penetração de espermatozoides Kremer (Fig. 3.2) pode ser construído no laboratório da seguinte forma.

1. Grudar, em uma lâmina de vidro, três reservatórios cortados de pequenos tubos de ensaio de plástico (raio de 3,5 mm aproximadamente).
2. Grudar uma segunda lâmina de vidro na primeira. A segunda lâmina deve ser 1,5 cm mais curta e posicionada a uma distância de 5 mm dos reservatórios. Esta construção evita o rastejamento do fluido seminal entre o tubo capilar e a lâmina de vidro.
3. Anexar uma escala centimétrica às lâminas.

Fig. 3.2 O medidor de penetração de espermatozoides de Kremer



Reservoir	Reservatório
Seal	Selo
Mucus	Muco
Semen	Sêmen

3.3.4.2 Procedimento

1. Introduzir aproximadamente 100 µl de sêmen liquefeito, obtido antes de 1 hora após a ejaculação, em cada um dos reservatórios de sêmen.
2. Aspirar o muco cervical em cada tubo capilar, certificando-se de que não sejam introduzidas bolhas de ar.
3. Selar uma das extremidades de cada tubo com um selante de tubo capilar, argila de modelagem ou material similar. Deve ser aplicado selante suficiente de modo que a coluna de muco se projete ligeiramente para fora da extremidade aberta do tubo.
4. Colocar a extremidade aberta do tubo capilar na lâmina para que ela projete cerca de 0,5 cm no reservatório que contém a amostra de sêmen.

5. Armazenar o dispositivo horizontalmente por 2 horas a 37 °C em uma câmara úmida (por exemplo, em papel de filtro saturado de água dentro de uma placa de Petri coberta) para evitar a secagem do sêmen e do muco.
6. Examinar o tubo capilar com óptica de contraste de fase em aumento de 100 ×, conforme descrito na Seção 3.3.4.3.
7. Retornar o dispositivo para a incubadora a 37 °C e inspecionar os tubos capilares novamente após 24 horas procurando a presença de espermatozoides com motilidade progressiva.

3.3.4.3 Observações

Após 2 horas, avaliar a distância de migração, a densidade de penetração, a redução da migração e a presença de espermatozoides com motilidade avançada.

1. Distância de migração: registrar a distância do final do tubo capilar no reservatório de sêmen até o espermatozoide mais distante no tubo.
2. Densidade de penetração: medir a 1 e 4,5 cm do final do tubo capilar no reservatório de sêmen. Em cada ponto, registrar o número médio de espermatozoides por campo de baixa potência (×100 LPF).

O número médio é obtido a partir de estimativas em cinco campos adjacentes de baixa potência e é expresso como uma classificação da densidade de penetração, conforme mostrado na Tabela 3.3. Para a classificação do teste, a maior densidade de penetração espermática é registrada, seja em 1 ou 4,5 cm.

Tabela 3.3 Ordem de classificação da densidade de penetração de espermatozoides

Número médio de espermatozoides por LPF	Ordem de classificação
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
> 100	7

3. Redução da migração: isto é calculado como a diminuição da densidade de penetração a 4,5 cm em comparação com a penetração a 1 cm. É expresso como a diferença na ordem de classificação.

Exemplo 1. A densidade de penetração a 1 cm é de 51 a 100 por LPF e a 4,5 cm é de 6 a 10. O valor de redução da migração é 3 (uma ordem de classificação 6 para uma ordem de classificação 3) (Tabela 3.3).

Exemplo 2. A densidade de penetração a 1 cm é de 21 a 50 por LPF e a 4,5 cm é de 51 a 100. O valor da redução de migração é zero porque a densidade de penetração, de fato, aumentou (uma ordem de classificação 5 para uma ordem de classificação 6) (Tabela 3.3).

4. Espermatozoides com motilidade avançada: determina a presença no muco cervical de espermatozoides com motilidade avançada às 2 e 24 horas

3.3.4.4 Interpretação

Os resultados são classificados como negativos, ruins ou bons de acordo com a Tabela 3.4.

3.4 Ensaios bioquímicos para a função dos órgãos sexuais acessórios

Tabela 3.4 Classificação dos resultados dos testes de tubos capilares

Distância de migração (cm)		Maior densidade de penetração (número de espermatozoides por LPF a 1 ou 4,5 cm)		Redução da migração de 1 para 4,5 cm (diminuição do número de ordem de classificação)		Duração dos movimentos progressivos no muco (horas)	Classificação
1		0		—		—	Negativa
< 3	ou	< 10	ou	> 3	ou	2	Pobre
4,5	e	> 50	e	< 3	e	> 24	Boa
Todas as outras combinações de resultados do teste							Suficiente

O sêmen de baixa qualidade pode resultar da produção testicular de espermatozoides anormais ou de um dano pós-testicular aos espermatozoides no epidídimo ou da ejaculação de secreções anormais das glândulas acessórias. As secreções das glândulas acessórias podem ser medidas para avaliar a função da glândula, por ex. ácido cítrico, zinco, gama glutamil transpeptidase e fosfatase ácida para a próstata; frutose e prostaglandinas para as vesículas seminais; L-carnitina livre, glicerofosfocolina (GPC) e α -glucosidase neutra para o epidídimo.

Uma infecção pode às vezes causar uma diminuição na secreção desses marcadores, mas a quantidade total de marcadores ainda pode estar dentro da faixa normal. Uma infecção também pode causar danos irreversíveis ao epitélio secretor, de forma que, mesmo após o tratamento, a secreção pode permanecer baixa (Cooper et al., 1990a; von der Kammer et al., 1991).

- Capacidade secretora da próstata. A quantidade de zinco, ácido cítrico (Möllering & Gruber, 1966) ou fosfatase ácida (Heite & Wetterauer, 1979) no sêmen fornece uma medida confiável da secreção da próstata e há boas correlações entre esses marcadores. Um ensaio espectrofotométrico para zinco é descrito na Seção 3.4.1.
- Capacidade secretora das vesículas seminais. Frutose no sêmen reflete a função secretora das vesículas seminais. Um método espectrofotométrico para a sua estimação é descrito na Seção 3.4.2.
- Capacidade secretora do epidídimo. L-Carnitina, GPC e α -glucosidase neutra são marcadores epididimários usados clinicamente. Mostrou-se que a α -glucosidase neutra é mais específica e sensível para desordens do epidídimo do que a L-carnitina e o GPC (Cooper et al., 1990a). Existem duas isoformas de α -glucosidase no plasma seminal: a forma principal e neutra origina-se apenas no epidídimo e a forma menor, ácida, principalmente na próstata. Um ensaio

espectrofotométrico simples para a α -glucosidase neutra é descrito na Seção 3.4.3.

Comentário: O conteúdo total de qualquer secreção de glândula acessória no ejaculado reflete a função secretora geral dessa glândula (Eliasson, 1975). Isto é obtido pela multiplicação do marcador da glândula acessória pelo volume de todo o ejaculado.

3.4.1 Medição de zinco no plasma seminal

3.4.1.1 Antecedentes

Um kit para medição de zinco sérico por ensaio espectrofotométrico está disponível comercialmente e pode ser adaptado para o sêmen. O método descrito abaixo é baseado no de Johnsen & Eliasson (1987), modificado para o uso de um leitor de placas de 96 poços com sensibilidade de 4 $\mu\text{mol/l}$ (Cooper et al., 1991). Os volumes de sêmen e reagentes podem ser ajustados proporcionalmente para espectrofotômetros usando cubetas de 3 ou 1 ml. As correções apropriadas devem ser feitas no cálculo dos resultados.

3.4.1.2 Princípio

O composto 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenol (5-Br-PAPS) liga-se ao zinco, produzindo uma alteração na cor.

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow \text{complexo } 5\text{-Br-PAPS-Zn}$, que absorve luz de comprimento de onda de 560 nm.

3.4.1.3 Reagentes

1. Um kit para a estimativa do zinco no soro está comercialmente disponível. Utilizar apenas o reagente de cor A (2 garrafas de 60 ml cada) e o reagente de cor B (1 garrafa de 30 ml).
2. Zinco padrão (100 $\mu\text{mol/l}$): dissolver 0,144 g de sulfato de zinco $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 50 ml de água purificada e diluir 100 vezes adicionando 1 ml a 99 ml de água purificada. Armazenar congelado a -20°C .
3. Curva padrão: diluir o padrão de zinco 100 $\mu\text{mol/l}$, preparado no passo 2, com água purificada para produzir cinco padrões adicionais de 80, 60, 40, 20 e 10 $\mu\text{mol/l}$.
4. Reagente de cor: misturar 4 partes do reagente de cor A com 1 parte do reagente de cor B (é necessário cerca de 25 ml para uma placa de 96 poços). Esta solução cromogênica é estável durante 2 dias à temperatura ambiente ou 1 semana a 4°C .
5. Pools internos congelados de controle de qualidade de plasma seminal (ver Seção 3.4.1.4, etapa 1).

3.4.1.4 Procedimento

1. Centrifugar a amostra de sêmen remanescente após a análise do sêmen por 10 minutos a 1000g. Decantar e armazenar o plasma seminal sem espermatozoides a -20°C até a análise. O plasma seminal sem espermatozoides

pode ser agrupado com outras amostras para fornecer um padrão para controle de qualidade interno em ensaios futuros.

2. Descongelar o plasma seminal sem espermazoides e misturar bem em um misturador de vórtice. Também descongelar e misturar uma alíquota de plasma seminal para controle interno de qualidade.
3. Preparar diluições de cada amostra de plasma seminal em replicado: para 300 µl de água purificada em cada um dos dois tubos de 1,5 mL, adicionar 5 µl de plasma seminal (com uma pipeta de deslocamento positivo) e misturar em vórtex por 5 segundos.
4. Adicionar uma réplica da alíquota de 40 µl das amostras de plasma seminal diluídas do passo 3 em uma placa de 96 poços. Incluir replicados em branco (40 µl de água purificada) e réplicas de 40 µl de cada um dos padrões.
5. Adicionar 200 µl de reagente de cor a cada poço e misturar por 5 minutos em um agitador de placas de 96 poços.
6. Ler a placa a 560 nm de comprimento de onda, usando a água em branco para definir o zero.

3.4.1.5 Cálculo

1. Ler a concentração de zinco na amostra a partir da curva padrão (mmol/l) comparando os valores de absorbância.
2. Rejeitar os resultados que estão acima do padrão superior e reavaliar essas amostras com maior diluição (usar água purificada para diluir).
3. Multiplicar os resultados por um fator de diluição de 61 (5 µl de plasma seminal diluído com 300 µl de água) para obter a concentração de zinco (mmol/l) no plasma seminal não diluído.
4. Os replicados devem concordar dentro de um 10%, ou seja (diferença entre estimativas/média das estimativas) $\times 100 \leq 10\%$. Se não, repita o ensaio com duas novas alíquotas de plasma seminal.
5. Multiplicar a concentração de zinco pelo volume total de sêmen (ml) para obter o teor total de zinco (µmol) do ejaculado.

3.4.1.6 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para o zinco é de 2,4 µmol por ejaculado (Cooper et al., 1991 e dados não publicados de TG Cooper).

3.4.2 Medição de frutose no plasma seminal

3.4.2.1 Antecedentes

O método descrito abaixo é baseado no de Karvonen & Malm (1955), modificado para uso com um leitor de placas de 96 poços com sensibilidade de 74 µmol/l (Cooper et al., 1990a). Os volumes de sêmen e reagentes podem ser ajustados proporcionalmente para espectrofotômetros usando cubetas de 3 ou 1 ml. As correções apropriadas devem ser feitas no cálculo dos resultados.

3.4.2.2 Princípio

Sob a influência do calor e do pH baixo, a frutose forma um complexo colorido com indol.

Frutose + indol $\xrightarrow{\text{calor + ácido}}$ complexo, que absorve luz de comprimento de onda de 470 nm.

3.4.2.3 Reagentes

Um kit para a estimativa de frutose no plasma seminal está comercialmente disponível. Alternativamente, prepare os seguintes reagentes.

1. Agente de desproteinização 1 (63 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4): dissolver 1,8 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água purificada.
2. Agente de desproteinização 2 (1 mol/l NaOH): dissolver 0,4 g de NaOH em 100 ml de água purificada.
3. Reagente de cor (indol 2 $\mu\text{mol/l}$ em conservante de benzoato 16 $\mu\text{mol/l}$): dissolver 200 mg de ácido benzóico em 90 ml de água purificada, agitando em banho-maria a 60 °C. Dissolver 25 mg de indol e preparar a 100 ml com água purificada. Filtrar (tamanho de poro de 0,45 μm) e guardar a 4 °C.
4. Padrão de frutose (2,24 mmol/l): dissolver 40 mg de D-frutose em 100 ml de água purificada. Armazenar a 4 °C ou congelar em alíquotas.
5. Curva padrão: Diluir o padrão de 2,24 mmol/l com água purificada para produzir quatro padrões adicionais de 1,12, 0,56, 0,28 e 0,14 mmol/l.
6. Pools internos congelados de controle de qualidade de plasma seminal (ver Seção 3.4.2.4, etapa 1).

3.4.2.4 Procedimento

1. Centrifugar a amostra de sêmen remanescente após a análise do sêmen por 10 minutos a 1000g. Decantar e armazenar o plasma seminal sem espermatozoides a -20 °C até a análise. O plasma seminal sem espermatozoides pode ser agrupado com outras amostras para fornecer um padrão para controle de qualidade interno em ensaios futuros.
2. Descongelar o plasma seminal sem espermatozoides e misturar bem em um misturador de vórtice. Também descongelar e misturar uma alíquota de plasma seminal para controle interno de qualidade.
3. Preparar diluições de cada amostra de plasma seminal em replicado: para 50 μL de água purificada em cada um dos dois tubos de 1,5 mL, adicionar 5 μl de plasma seminal (com uma pipeta de deslocamento positivo) e misturar.
4. Deproteinizar: para os 55 μl da amostra diluída, adicionar 12,5 μl de 63 $\mu\text{mol/l}$ de ZnSO_4 e 12,5 μl de NaOH 0,1 mol/l e misturar. Deixar repousar durante 15 minutos à temperatura ambiente, depois centrifugar a 8000g por 5 minutos.

5. Transferir 50 µl de sobrenadante de cada amostra para um tubo de ensaio. Incluir replicados em branco (50 µl de água) e réplicas de 50 µl de cada padrão.
6. Adicionar 50 µl de reagente de indol a cada tubo e misturar.
7. Adicionar 0,5 ml de ácido clorídrico (HCl) concentrado (32% v/v) a cada amostra, cobri-lo com filme para laboratório autosselável e moldável e misturar cuidadosamente em uma capela de exaustão.
8. Aquecer durante 20 minutos a 50 °C em banho de água. Misturar e deixar esfriar em água gelada por 15 minutos.
9. Transferir cuidadosamente 250 µl com uma pipeta de deslocamento positivo para uma placa de 96 poços em uma capela de exaustão.
10. Selar a placa de 96 poços com filme adesivo transparente para proteger o espectrofotômetro do ácido.
11. Ler a placa a 470 nm de comprimento de onda, usando a água em branco para definir o zero.

3.4.2.5 Cálculo

1. Ler a concentração de frutose na amostra a partir da curva padrão (mmol/l) comparando os valores de absorbância.
2. Rejeitar os resultados que estão acima do padrão superior e reavaliar essas amostras com maior diluição (usar água purificada para diluir).
3. Multiplicar os resultados de cada amostra pelo fator de diluição de 16 (5 µl de plasma seminal diluído com 75 µl de água e agentes desproteinizantes) para obter a concentração de frutose (mmol/l) no plasma seminal não diluído.
4. Os replicados devem concordar dentro de um 10%, ou seja (diferença entre estimativas/média das estimativas) $\times 100 \leq 10\%$. Se não, repita o ensaio com duas novas alíquotas de sêmen.
5. Multiplicar a concentração de frutose pelo volume total de sêmen (ml) para obter o teor total de frutose (µmol) do ejaculado.

3.4.2.6 Limite inferior de referência

O limite inferior de referência para a frutose é de 13 µmol por ejaculado (Cooper et al., 1991 e dados não publicados de TG Cooper).

Comentário: A baixa frutose no sêmen é característica da obstrução do ducto ejaculatório, ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000), ejaculação retrógrada parcial e deficiência androgênica.

3.4.3 Medição de α -glucosidase neutra no plasma seminal

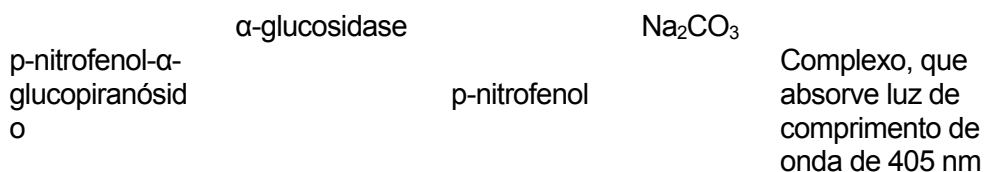
3.4.3.1 Antecedentes

O plasma seminal contém tanto uma isoenzima α -glucosidase neutra, que se origina no epidídimo, quanto uma isoenzima ácida, produzida pela próstata. Esta

última pode ser inibida seletivamente pelo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Paquin et al., 1984) para permitir a medição da α -glicosidase neutra, que reflete a função epididimal. A explicação para a degradação do substrato não relacionado à glicosidase, usando o inibidor castanospermina, torna o ensaio mais sensível. O método descrito abaixo é para uso com um leitor de placas de 96 poços com sensibilidade de 1,9 mU/ml (Cooper et al., 1990b). Os volumes de sêmen e reagentes podem ser ajustados proporcionalmente para espectrofotômetros com cubetas de 3 ou 1 ml. As correções apropriadas devem ser feitas no cálculo dos resultados.

3.4.3.2 Princípio

A glucosidase converte o substrato glicopiranosídeo sintético em p-nitrofenol, que fica amarelo ao ser adicionado carbonato de sódio.



3.4.3.3 Reagentes

Um kit para a estimativa de α -glucosidase neutra epididimal no sêmen está comercialmente disponível. Somente kits que incluam SDS e castanospermina são recomendados para a dosagem dessa enzima no sêmen. Alternativamente, prepare os seguintes reagentes.

1. Tampão 1 (fosfato 0,2 mol/l, pH 6,8): dissolver 4,56 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água purificada. Dissolver 2,72 g de KH_2PO_4 em uma alíquota separada de 100 ml de água purificada. Misturar volumes aproximadamente iguais de cada um até que o pH seja 6,8.
2. Tampão 2: dissolver 1 g de SDS em 100 ml de tampão 1. O SDS irá precipitar durante o armazenamento a 4 °C, mas redissolverá em aquecimento suave.
3. Reagente corante 1 (para parar a reação, 0,1 mol/l de carbonato de sódio): dissolver 6,20 g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 500 ml de água.
4. Reagente de cor 2: Dissolver 0,1 g de SDS em 100 ml de reagente de cor 1.
5. Substrato p-nitrofenol glucopiranosídeo (PNPG) (5 mg/mL): dissolver 0,1 g de PNPG em 20 mL de tampão 2 e aquecer a solução em uma placa quente a 50 °C agitando durante cerca de 10 minutos. Alguns cristais podem permanecer não dissolvidos. A solução deve ser mantida a 37 °C durante o uso. Fazer uma nova solução para cada ensaio.
6. Inibidor da glucosidase para amostras de sêmen (castanospermina, 10 mmol/l): dissolver 18,9 mg de castanospermina em 10 ml de água purificada. Diluir este 10 vezes em água purificada para dar 1 mmol/l de solução de trabalho. Congelar alíquotas de aproximadamente 1 ml a -20 °C.
7. Curva padrão do produto p-nitrofenol (PNP) (5 mmol/l): dissolver 69,5 mg de PNP em 100 ml de água purificada, aquecendo a solução, se necessário.

Armazenar a 4 °C no escuro em garrafa de vidro marrom ou coberta de uma folha de alumínio. Fazer uma nova solução padrão a cada 3 meses.

8. Preparar uma curva padrão (dentro da última hora de incubação): colocar 400 µl de PNP 5 mmol/l em um balão volumétrico de 10 ml e fazer até 10 ml junto com o reagente de cor 2 (200 µmol/l). Diluir o padrão de 200 µmol/l com o reagente de cor 2 para obter quatro padrões adicionais de 160, 120, 80 e 40 µmol/l PNP.
9. Pools internos congelados de controle de qualidade de plasma seminal (ver Seção 3.4.3.4, etapa 1).

3.4.3.4 Procedimento

1. Centrifugar a amostra de sêmen remanescente após a análise do sêmen por 10 minutos a 1000g. Decantar e armazenar o plasma seminal sem espermatozoides a -20 °C até a análise. O plasma seminal sem espermatozoides pode ser agrupado com outras amostras para fornecer um pool de controle de qualidade como padrão interno para ensaios futuros.
2. Descongelar o plasma seminal sem espermatozoides e misturar bem em um misturador de vórtice. Também descongelar e misturar uma alíquota de plasma seminal para controle interno de qualidade.
3. Colocar amostras replicadas de 15 µl de plasma seminal em cada um dos dois tubos de 1,5 ml usando uma pipeta de deslocamento positivo. Incluir replicados em branco (15 µl de água) e quadruplicar 15 µl para amostras internas de controle de qualidade de pools de sêmen.
4. Para duas das amostras internas de controle de qualidade, adicionar 8 µl de 1 mmol/l de castanospermina para fornecer o valor em branco do plasma seminal.
5. Adicionar 100 µl de solução de substrato PNPG, a 37 °C, a cada tubo.
6. Agitar cada tubo e incubar a 37 °C por 2 horas (temperatura exata e controle de tempo são cruciais).
7. Parar a incubação após 2 horas adicionando 1 ml de reagente de cor 1 e misturar.
8. Transferir 250 µl de amostras e padrões para a placa de 96 poços.
9. Ler a placa em um leitor de placas de 96 poços a 405 nm de comprimento de onda em 60 minutos, usando água em branco para definir o zero.

3.4.3.5 Cálculo

1. Ler a concentração de PNP produzida pela amostra a partir da curva padrão (µmol/l) comparando os valores de absorbância.
2. Rejeitar as amostras acima do padrão superior e reavaliar essas amostras após a diluição (usar o tampão 1 para diluir).

3. Multiplicar pelo fator de correção (0,6194; veja Nota) para obter a atividade da glucosidase neutra no plasma seminal não diluído (UI/l).
4. Subtrair a atividade (UI/l) do valor em branco do plasma seminal com castanospermina de cada amostra para obter a atividade corrigida (relacionada com a glucosidase).
5. Os replicados devem concordar dentro de um 10%, ou seja (diferença entre estimativas/média das estimativas) $\times 100 \leq 10\%$. Se não, repita o ensaio com duas novas alíquotas de plasma seminal.
6. Multiplicar a atividade da glucosidase corrigida pelo volume total de sêmen (ml) para obter a atividade de glicosidase (mU) do ejaculado.

Nota: Uma unidade internacional (UI) de atividade da glucosidase é definida como a produção de 1 μmol do produto (PNP) por minuto a 37 °C. Neste ensaio, a atividade é derivada de 15 μl de plasma seminal em um volume total de 1,115 μl durante 120 minutos, pelo que o fator de correção é $(1115/15)/120 = 0,6194$.

3.4.3.6 Limite de referência

O limite inferior de referência para a α -glucosidase neutra é de 20 mU por ejaculado (Cooper et al., 1991 e dados não publicados de TG Cooper).

3.5 Análise de espermatozoides assistida por computador

3.5.1 Introdução

Até recentemente, não era possível medir a concentração de espermatozoides através da Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) devido às dificuldades em distinguir espermatozoides de detritos (ESHRE, 1998). No entanto, os avanços na tecnologia, particularmente na utilização de corantes fluorescentes de DNA e algoritmos de detecção de caudas, pode permitir agora medir a concentração de espermatozoides e, consequentemente, a concentração de espermatozoides com motilidade progressiva (Zinaman et al., 1996; Garrett et al., 2003). Desde que cuidados adequados sejam tomados na preparação de espécimes e uso do instrumento, CASA pode ser usada para algumas aplicações de diagnóstico de rotina. Procedimentos de controle de qualidade são necessários para estabelecer e manter um alto padrão de operação do instrumento (ver Capítulo 7).

Vários fabricantes produzem sistemas CASA. Estas máquinas são capazes de medir a motilidade e cinemática espermática, e algumas podem ser usadas para estimar a concentração de espermatozoides. Algumas têm módulos morfológicos semiautomáticos. CASA tem duas vantagens sobre os métodos manuais, incluindo a avaliação da motilidade, concentração e morfologia: tem alta precisão e fornece dados quantitativos sobre os parâmetros cinemáticos de espermatozoides (progressão para a frente e motilidade hiperativada, características de células capazes).

Alguns estudos sugeriram que as estimativas de concentração e de movimento características dos espermatozoides progressivamente móveis de CASA estão significativamente relacionadas com taxas de fertilização *in vitro* e *in vivo*, bem como para o tempo de concepção (Liu et al., 1991a ; Barrat et al., 1993; Irvine et al., 1994; Krause, 1995; Donnelly et al., 1998; Larsen et al., 2000; Garrett et al., 2003; Shibahara et al., 2004). O uso de CASA para medir a motilidade espermática e concentração está descrito nas Seções 3.5.2 e 3.5.3, respectivamente, enquanto a Seção 3.5.4 contém um comentário sobre o estado da análise morfológica auxiliada por computador.

3.5.2 Uso de CASA para avaliar a motilidade dos espermatozoides

Os instrumentos CASA são mais bem utilizados para análises cinemáticas de espermatozoides, pois podem detectar células móveis. Estimativas de porcentagem de motilidade podem não ser confiáveis, pois dependem da determinação do número de espermatozoides imóveis e os fragmentos podem ser confundidos com espermatozoides imóveis.

Muitos fatores afetam o desempenho dos instrumentos CASA, por exemplo, preparação da amostra, velocidade de fotogramas, concentração espermática e profundidade da câmara de contagem (Davis e Katz, 1992; Mortimer, 1994a, b; Kraemer et al., 1998). No entanto, resultados confiáveis e reprodutíveis podem ser obtidos se os procedimentos apropriados forem seguidos (Davis & Katz, 1992). Diretrizes sobre o uso de CASA (Mortimer et al., 1995; ESHRE, 1998) devem ser consultadas.

Ao usar a CASA para obter parâmetros de movimento, os rastros de pelo menos 200 espermatozoides móveis por amostra devem ser analisados. Isso implica que muito mais espermatozoides precisarão ser detectados. Se os espermatozoides forem classificados por tipo de movimento ou se forem planejadas outras análises de variabilidade dentro de um espécime, os rastros de pelo menos 200 espermatozoides móveis, e se possível 400, serão necessários. O número de espermatozoides analisados em cada amostra deve ser padronizado.

O instrumento CASA deve estar ligado a um software de computador que permita a organização de dados e a análise estatística. As distribuições de muitos dos parâmetros de movimento não são gaussianas; a mediana, em vez da média, é mais apropriada como resumo da tendência central de cada variável. As medições em espermatozoides individuais podem precisar ser transformadas matematicamente antes que certas análises estatísticas sejam feitas.

3.5.2.1 Procedimento

Cada instrumento CASA deve ser configurado corretamente para seu uso antecipado, a fim de garantir um ótimo desempenho. Os fabricantes indicam configurações adequadas, mas os usuários devem verificar se o instrumento está funcionando com o grau necessário de repetibilidade e confiabilidade. O uso de materiais de controle de qualidade apropriados, por ex. gravações de vídeo, é essencial (ver Apêndice 7, seção A7.5). Vários autores discutiram as configurações da CASA em um contexto geral (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994b; ESHRE, 1998).

3.5.2.2 Preparando as amostras

As amostras de sêmen para a CASA devem ser coletadas e preparadas conforme descrito no Capítulo 2. O sistema CASA deve manter a amostra a 37 °C, porque o movimento do espermatozoide é sensível à temperatura. Características de motilidade e concentração espermática podem ser avaliadas em sêmen não diluído. A motilidade espermática pode ser avaliada em amostras com concentrações de espermatozoides entre 2×10^6 por ml e 50×10^6 por ml (Garrett et al., 2003).

Em amostras com altas concentrações de espermatozoides (isto é, maiores que 50×10^6 por ml), podem ocorrer colisões com alta frequência e provavelmente induzirão erros. Essas amostras devem ser diluídas, de preferência com plasma seminal do mesmo homem.

1. Centrifugar uma parte da amostra a 16.000g durante 6 minutos para produzir plasma seminal sem espermatozoides.
2. Diluir a amostra de sêmen original com o plasma seminal sem espermatozoides para reduzir a concentração abaixo de 50×10^6 por ml.

Câmaras de contagem descartáveis, de 20 µm de profundidade, fornecem resultados confiáveis. Este é um sistema de câmara dupla; ambas as câmaras devem ser preenchidas e avaliadas. Vários campos representativos devem ser examinados: a leitura de seis campos por câmara (12 campos no total) geralmente dá resultados confiáveis. Pelo menos 200 espermatozoides devem ser avaliados em cada câmara. Os mesmos princípios de controle de qualidade se aplicam às estimativas padrão de motilidade (ver Seção 2.5.2). As amostras podem ser analisadas diretamente ou a partir de uma gravação de vídeo. A análise de gravações de vídeo (de fita de vídeo, CD-ROM ou DVD) permite uma melhor padronização e implementação de procedimentos de garantia de qualidade (consulte o Apêndice 7, seção A7.5). O fabricante geralmente recomendará o tipo de dispositivo de gravação a ser usado e a configuração de iluminação necessária para o contraste máximo entre as cabeças dos espermatozoides e o plano de fundo.

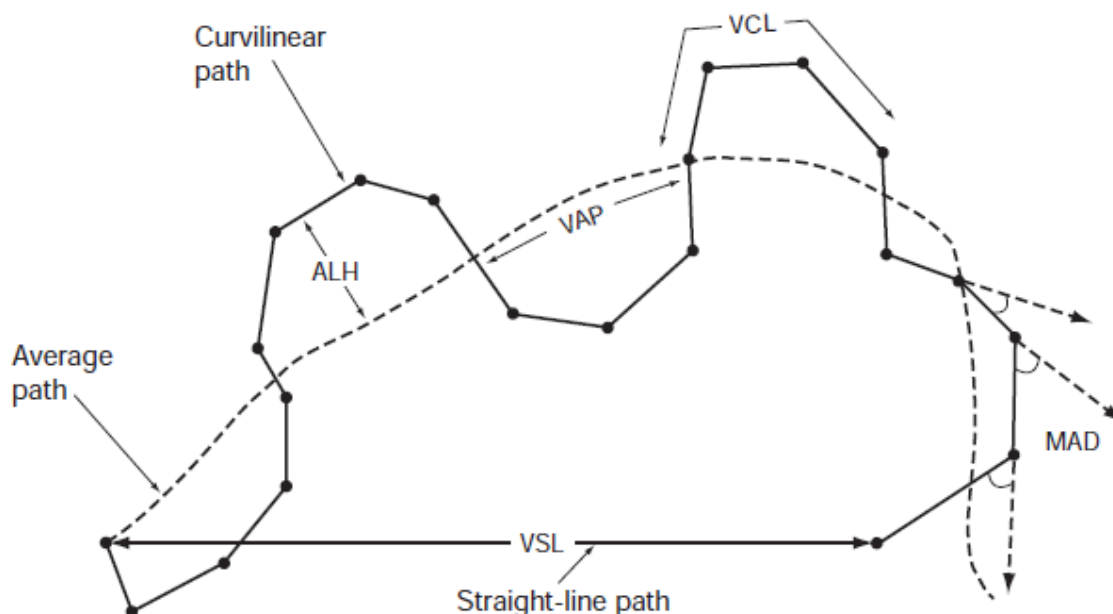
Há algum desacordo em relação ao tempo pelo qual os espermatozoides devem ser seguidos para obter resultados precisos, mas um mínimo de 1 segundo deve ser suficiente para as medidas básicas de CASA (Mortimer, 1994b).

3.5.2.3 Terminologia de CASA

Alguma terminologia padrão para variáveis medidas pelos sistemas CASA é ilustrada na Fig. 3.3.

1. VCL, velocidade curvilínea (µm/s). A velocidade média de um espermatozoide ao longo do caminho curvilíneo real, como percebido em duas dimensões no microscópio. Avalia o vigor celular.
2. VSL, velocidade reta (retilínea) (µm/s). Velocidade média do tempo da cabeça de um espermatozoide ao longo da linha reta entre a primeira posição detectada e a última.

Fig. 3.3 Terminologia padrão para variáveis medidas pelos sistemas CASA



Curvilinear path	Caminho curvilíneo
VCL	VCL
Average path	Caminho médio
ALH	ALH
VAP	VAP
MAD	MAD
VSL	VSL
Straight-line path	Caminho linear

3. VAP, velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$). Velocidade média de uma cabeça de espermatozoide ao longo do seu caminho médio. Este caminho é calculado suavizando a trajetória curvilínea de acordo com os algoritmos do instrumento CASA; esses algoritmos variam entre instrumentos, portanto, os valores podem não ser comparáveis entre sistemas.
4. ALH, amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm). Magnitude de deslocamento lateral de uma cabeça de espermatozoide sobre o seu caminho médio. Pode ser expresso como um máximo ou uma média de tais deslocamentos. Instrumentos CASA diferentes calculam a ALH usando algoritmos diferentes, portanto, os valores podem não ser comparáveis entre sistemas.
5. LIN, linearidade. A linearidade de um caminho curvilíneo, VSL/VCL .
6. WOB, oscilação. Uma medida de oscilação do caminho real sobre o caminho médio, VAP/VCL .
7. STR, retidão. Linearidade do caminho médio, VSL/VAP .
8. BCF, frequência de batida cruzada (Hz). A taxa média na qual o caminho curvilíneo cruza o caminho médio.
9. MAD, deslocamento angular médio (graus). Os valores absolutos de tempo médio do ângulo de giro instantâneo da cabeça do espermatozoide ao longo de sua trajetória curvilínea.

Nota: Diferentes instrumentos CASA usam diferentes algoritmos matemáticos para calcular muitas dessas variáveis de movimento. A comparabilidade das medições em todos os instrumentos ainda não é conhecida.

3.5.3 Uso de CASA para estimar a concentração de espermatozoides

O uso de corante fluorescente para DNA junto com CASA permite que a concentração de espermatozoides móveis e a percentagem de motilidade sejam determinadas com precisão, mas adesão escrupulosa à técnica é necessária (Garrett et al., 2003). Por exemplo, se fossem usadas câmaras descartáveis, é importante avaliar a amostra a várias distâncias diferentes do local de carregamento da câmara, pois a distribuição de espermatozoides por toda a câmara não será uniforme (Douglas-Hamilton et al., 2005b). A validação com um hemocítmetro é essencial.

Concentrações de espermatozoides entre 2×10^6 por ml e 50×10^6 por ml podem ser medidas (Garrett et al., 2003). As amostras com uma concentração de espermatozoides superior a 50×10^6 por ml terão de ser diluídas (ver Seção 3.5.2.2).

Comentário: O instrumento CASA detecta e conta as cabeças de espermatozoides fluorescentes. Sem avaliação microscópica, não há como saber se os espermatozoides estão intactos (ou seja, se a cabeça está ligada a uma cauda).

3.5.4 Avaliação morfométrica espermática auxiliada por computador

A análise de imagens tem o potencial de trazer grandes avanços em quantificação, objetividade e reprodutibilidade na avaliação da morfologia espermática. Sistemas comerciais estão disponíveis para quantificar a morfologia da cabeça e da peça intermediária do espermatozoide e, possivelmente, a peça principal. No entanto, os defeitos da cauda que afetam a motilidade podem ser avaliados de forma mais direta pelo uso da CASA para medir a motilidade e o movimento. Os sistemas CASA geralmente classificam a cabeça do espermatozoide e a peça intermediária como normais ou anormais e fornecem a média e o desvio padrão ou mediana das dimensões da cabeça e da peça intermediária, elipticidade e regularidade da cabeça e uma medição dependente de coloração da área acrossômica.

Os sistemas automatizados têm o potencial de ter uma maior objetividade, precisão e reprodutibilidade do que os sistemas manuais (Menkveld et al., 1990). Precisão e reprodutibilidade podem ser inferiores a 7% (Garrett & Baker, 1995), o que é superior à avaliação manual por um técnico experiente. A reprodutibilidade e a precisão dos resultados da avaliação morfométrica espermática assistida por computador (CASMA) podem, no entanto, estar comprometida por inconsistências metodológicas, como foco, iluminação, preparação de amostras e coloração (Lacquet et al., 1996; Menkveld et al., 1997) e por dificuldades técnicas em diferenciar corretamente os espermatozoides dos detritos seminais, particularmente quando a concentração de espermatozoides é baixa (Garrett & Baker, 1995; Menkveld et al., 1997; Coetzee et al., 1999a, b). A natureza da avaliação automatizada significa que não há como compensar defeitos e artefatos da preparação. Assim, pequenas diferenças no sombreamento de fundo em relação à coloração da célula podem resultar em classificação incorreta ou na incapacidade de identificar uma célula como espermatozoide, com um consequente viés nos resultados.

Assim como na avaliação da morfologia manual, os procedimentos e instrumentos devem ser padronizados e o controle de qualidade deve ser mantido para garantir resultados comparáveis e confiáveis. O sêmen pode ser tratado como na Seção 2.13.2.4 para reduzir o fundo para as gravações da CASMA. Se a concentração de espermatozoides for baixa ($< 2 \times 10^6$ por ml), as amostras precisarão ser concentradas por centrifugação, como descrito na Seção 2.13.2.2.

Nota: A centrifugação pode afetar a morfologia espermática e seu uso deve ser registrado.

Dois estudos relataram relações significativas entre os resultados da CASMA e os desfechos de fertilidade. Coetzee et al. (1999c) descobriram que os resultados normais da morfologia espermática são preditores significativos de taxas de fertilização in vitro e gravidez. Garrett et al. (2003) descobriram que a porcentagem de espermatozoides no sêmen que exibiam a morfologia da cabeça característica daqueles que estão ligados à zona pelúcida (“zona preferida”, %Z) juntamente com a velocidade linear (VSL) no sêmen estava significativa e independentemente relacionada com taxas de gravidez natural em um grande grupo de casais subférteis. As relações entre %Z, VSL e fertilidade pareciam ser contínuas, e nenhum valor limiar foi identificado acima do qual não houve aumento adicional na taxa de gravidez. Mais estudos de resultados de fertilidade em grandes populações são necessários para refinar a aplicação da CASA para medir a morfologia espermática.

Sistemas automatizados podem ter um papel no fornecimento de dados para sistemas de controle de qualidade, mas são necessárias mais pesquisas para demonstrar seu benefício nas clínicas.

CAPÍTULO 4 Procedimentos de pesquisa

Quando testes de função espermática devam ser realizados, é fundamental que os espermatozoides sejam separados do plasma seminal dentro de 1 hora após a ejaculação, para limitar qualquer dano aos espermatozoides por produtos de células não espermáticas. À medida que aumenta o nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que regulam a função espermática, também haverá oportunidades para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos. Por exemplo, dados recentes enfatizam a importância da compactação e integridade do DNA nuclear na determinação da competência funcional dos espermatozoides humanos. Evidência emergente sugere associações entre integridade do DNA e organização da cromatina em espermatozoides e fertilidade (Sakkas et al., 1998; Aitken & Krausz, 2001; Virro et al., 2004).

Da mesma forma, avanços em nossa compreensão das vias de transdução de sinal que regulam a função espermática terão implicações para o desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de gerar informações detalhadas sobre a natureza precisa dos processos que são defeituosos nos espermatozoides de homens inférteis. A fim de obter entendimentos mais profundos sobre a base biológica da infertilidade masculina, uma bateria de testes funcionais foi desenvolvida visando avaliar a competência dos espermatozoides humanos para cumprir os processos fundamentais essenciais à concepção: ligação à zona pelúcida, exocitose acrossomal e fusão com a membrana vitelina do oócito.

4.1 Espécies que reagem ao oxigênio

4.1.1 Introdução

A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a presença de alta atividade das enzimas citoplasmáticas, como a creatinofosfoquinase, podem refletir em espermatozoides anormais com excesso de citoplasma residual na peça intermediária (Rao et al., 1989; Gomez et al., 1996; Aitken et al., 2004).

As espécies reativas de oxigênio são metabólitos do oxigênio e incluem o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxila e hidroperoxila e o óxido nítrico. Quando presentes em excesso, podem iniciar alterações patológicas induzindo dano oxidativo a lipídios celulares, proteínas e DNA (Griveau & Le Lannou, 1997; Aitken et al., 2003; Henkel et al., 2004). A maioria das células está equipada com sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) ou sistemas antioxidantes não enzimáticos (ácido úrico, ácido ascórbico, α -tocoferol) e quando estas defesas estão sobrecarregadas, a função espermática é prejudicada (Agarwal et al., 2004).

Na ejaculação humana, as espécies reativas de oxigênio são produzidas por ambos os espermatozoides (Aitken & Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987; Iwasaki e Gagnon, 1992) e os leucócitos (Aitken & West, 1990). O plasma seminal possui quelantes antioxidantes de radicais livres e enzimas antioxidantes, que podem ser deficientes em alguns homens (Jones et al., 1979; Smith et al., 1996). Assim, a remoção do plasma seminal durante a preparação dos espermatozoides para a concepção assistida (ver Capítulo 5) pode tornar essas células vulneráveis ao ataque oxidativo. A alta produção de EROs pode causar dano peroxidativo e perda da função espermática, bem como danos no DNA tanto no genoma nuclear quanto no mitocondrial (Sawyer et al., 2003). Ensaio de sobrevivência espermática são frequentemente usados para avaliar a qualidade dos espermatozoides humanos. Os resultados de tais ensaios são altamente correlacionados com o estado de peroxidação lipídica dos espermatozoides (Gomez et al., 1998).

Um procedimento quimioluminescente, empregando sondas como luminol ou lucigenina, pode ser usado para medir a produção de EROs e a atividade redox dos espermatozoides humanos.

4.1.2 Medição de espécies reativas de oxigênio geradas por suspensões de espermatozoides

4.1.2.1 Princípio

Neste procedimento, um luminômetro sensível é usado para medir baixas quantidades de luz geradas por espermatozoides humanos na presença de uma sonda quimioluminescente, como o luminol. A metodologia descrita emprega uma mistura de luminol e peroxidase de rábano para fazer medições sensíveis da geração de peróxido de hidrogênio. Outras sondas (por exemplo, lucigenina) podem também ser utilizadas para monitorizar a produção de ERO por ejaculados humanos lavados (Aitken et al., 1992; McKinney et al., 1996).

Os sinais gerados em resposta à sonda formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) são específicos para a população de leucócitos, uma vez que não existem receptores de FMLP na superfície de espermatozoides humanos (Krausz et al., 1992). As respostas podem ser calibradas com suspensões contendo números conhecidos de leucócitos polimorfonucleares (ver Fig. 4.1).

Comentário 1: A atividade precisa medida por essas sondas ainda está aberta a questões (Aitken et al., 2004), mas os dados gerados refletem a função dos espermatozoides (Zorn et al., 2003; Said et al., 2004).

Comentário 2: Um único leucócito pode gerar pelo menos 100 vezes mais EROs que um espermatozoide. Um baixo nível de contaminação por leucócitos pode, portanto, ter uma grande influência nos sinais quimioluminescentes gerados por uma suspensão espermática.

4.1.2.2 Reagentes

1. Solução salina equilibrada de Hanks (HBSS), sem vermelho de fenol: consulte o Apêndice 4, seção A4.5.
2. Meio de Krebs-Ringer (KRM), sem vermelho de fenol: consulte o Apêndice 4, seção A4.7.
3. Luminol, 25 mmol/l: dissolver 29 mg de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) em 10 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

4. Peroxidase de rábano (HRP) (tipo VI, 310 UI/mg proteína): dissolver 5 mg (1550 UI) em 1 ml de KRM.
5. FMLP (sonda específica para leucócitos, 10 mmol/l): dissolver 44 mg de FMLP em 10 ml de DMSO.
6. Solução 13-acetato de 12-miristato de forbol (PMA), 1 mmol/l: dissolver 6,2 mg de PMA em 10 mL de DMSO. Diluir 1 mmol/l de PMA 100 vezes em DMSO para obter uma solução de trabalho de 10 μ mol/l.
7. Zimosano.
8. Gelatina: 0,1% (1 g/l) em HBSS.

4.1.2.3 Opsonização do zimosano

1. Suspender 500 mg de zimosano em 10 ml de HBSS.
2. Agitar vigorosamente.
3. Ferver por 20 minutos em um béquer, coberto para evitar a evaporação.
4. Centrifugar a 500g por 5 minutos.
5. Lavar o sedimento com 10 ml de HBSS.
6. Repetir a lavagem.
7. Ressuspender o sedimento em 5 ml de soro humano fresco por pipetagem suave.
8. Incubar por 20 minutos.
9. Centrifugar a 500g por 5 minutos.
10. Lavar o sedimento com 10 ml de HBSS.
11. Repetir a lavagem.
12. Ressuspender o sedimento para uma concentração de 50 mg/ml em 10 ml de HBSS + 0,1% (1 g/l) de gelatina por pipetagem suave.
13. Armazenar a -20°C até que seja necessário.

4.1.2.4 Detectando geração espontânea de EROs

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3) e remover um volume contendo pelo menos 10×10^6 espermatozoides para avaliação de EROs.
2. Lavar os espermatozoides (ver Seção 5.3) em KRM e ajustar para 10×10^6 espermatozoides por ml.

3. Pipetar 400 μ l da suspensão de espermatozoides lavados suspensos em KRM sem vermelho de fenol em um recipiente luminômetro descartável. Tomar cuidado para não criar bolhas de ar.
4. Adicionar 4 μ l de 25 mmol/l de luminol.
5. Adicionar 8 μ l de solução de peroxidase de rábano (1550 UI/ml).
6. Monitorar o sinal quimioluminescente no luminômetro a 37 °C durante cerca de 5 minutos até estabilizar.

A geração de EROs pelos leucócitos seminais pode ser estimulada pela adição de FMLP, zimosano ou PMA, mas a PMA também estimula a produção de EROs pelos espermatozoides.

4.1.2.5 FMLP provocando a geração de EROs pelos leucócitos

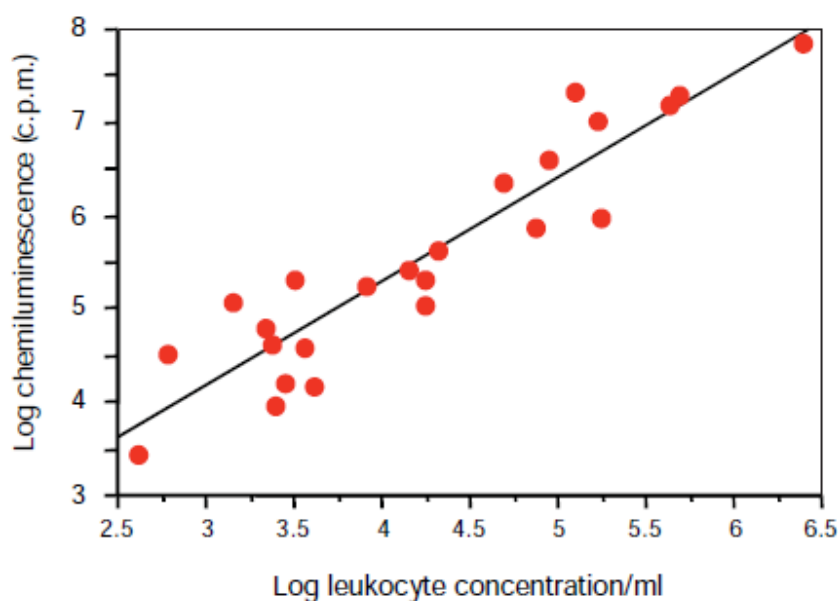
Adicionar 2 μ l de FMLP a 10 mmol/l à amostra acima para estimular um sinal quimioluminescente de quaisquer leucócitos que estejam presentes na suspensão de espermatozoides (ver Fig. 4.2).

4.1.2.6 Zimosano provocando a geração de EROs pelos leucócitos

Adicionar 20 μ l do material de zimosano opsonizado à amostra acima para estimular um sinal quimioluminescente de quaisquer leucócitos que estejam presentes na suspensão espermática. O tamanho do sinal gerado subsequentemente é diretamente proporcional ao nível de contaminação leucocitária (ver Fig. 4.1).

Fig. 4.1 Quimioluminescência gerada em resposta ao tratamento com zimosano opsonizado

Existe uma relação log linear entre a concentração de leucócitos e o sinal de quimioluminescência.



Log chemiluminescence (c.p.m.)	Quimioluminescência do log (c.p.m.)
Log leukocyte concentration/ml	Log de concentração de leucócitos/ml

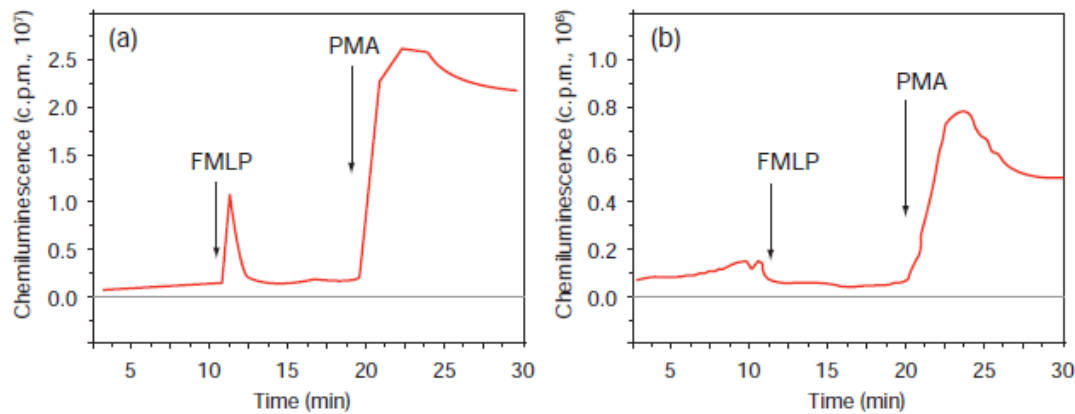
Dados cortesia de RJ Aitken.

4.1.2.7 PMA provocando a geração de EROs por leucócitos e espermatozoides

- 1. Diluir a solução estoque de PMA 100 vezes em DMSO para obter uma solução estoque de 10 µmol/l.
- 2. Aguardar o sinal de FMLP ou de zimosano opsonizado diminuir.
- 3. Adicionar 4 µl de 10 µmol/l de PMA à mesma suspensão espermática (concentração final de 100 nmol/l) para estimular um sinal quimioluminescente dos espermatozoides (ver Fig. 4.2).

Fig. 4.2 Contribuições relativas feitas por subpopulações de leucócitos e espermatozoides para a capacidade de geração de oxigênio reativo da suspensão celular

(a) Na presença de contaminação por leucócitos, uma explosão de geração de EROs é observada na adição da sonda específica para leucócitos FMLP. A adição subsequente de PMA gera um sinal quimioluminescente intenso e sustentado pelas populações de espermatozoides e leucócitos. (b) Na ausência de contaminação por leucócitos, a resposta do FMLP é perdida, enquanto a PMA induz um sinal quimioluminescente pronunciado dos espermatozoides (ver também Krausz et al., 1992).



Chemiluminescence (c.p.m., 10 ⁷)	Quimioluminescência (c.p.m., 10 ⁷)
Time (min)	Tempo (min)
Chemiluminescence (c.p.m., 10 ⁶)	Quimioluminescência (c.p.m., 10 ⁶)
Time (min)	Tempo (min)

Dados cortesia de RJ Aitken.

4.1.2.8 Resultados

Examinar o gráfico após a estimulação para evidências de contaminação por leucócitos.

4.2 Testes de interação espermatozoide-oócito humano

A ligação dos espermatozoides à zona pelúcida inicia a reação acrossômica, libera e expõe os componentes acrossomais líticos ligados e permite que os espermatozoides penetrem através da matriz da zona, impulsionados pelo aumento do empuxo flagelar da motilidade hiperativada. Para avaliar os eventos de ligação, podem ser utilizados oócitos humanos não viáveis, não fertilizáveis, de autópsia, ovários removidos cirurgicamente ou fertilização in vitro falha. Estes testes podem ser realizados usando oócitos que foram armazenados em sal, mas geralmente são limitados pela falta de disponibilidade de oócitos humanos (Yanagimachi et al., 1979; Kruger et al., 1991; Liu & Baker, 1992b; Liu et al., 2004).

4.3 Testes de ligação da zona pelúcida humana

Um ensaio de ligação à zona pelúcida, o ensaio hemizona (Burkman et al., 1988), envolve a microdissecção da zona pelúcida em metades iguais e a exposição de cada metade correspondente à mesma concentração de espermatozoides teste ou controle. Outro ensaio de ligação de espermatozoides à zona pelúcida (Liu et al., 1988, 1989) envolveu marcar os espermatozoides da amostra teste com um corante fluorescente (por exemplo fluoresceína) e uma amostra de esperma de controle com outro corante (por exemplo, rodamina). O número de espermatozoides das amostras de teste e controle ligados à mesma zona intacta é contado e informado como uma razão. Os resultados de ambos os testes de ligação à zona mostraram estar correlacionados com taxas de fertilização in vitro (Liu & Baker, 2003).

Pode ser clinicamente útil avaliar o número de espermatozoides ligados em casos de fertilização in vitro baixa ou falha, infertilidade idiopática e teratozoospermia (Franken et al., 1989; Liu & Baker, 1992a, 2004). A ligação de poucos ou nenhum espermatozoide à zona pelúcida geralmente indica um defeito espermático.

4.4 Avaliação da reação acrossômica

A reação fisiológica acrossômica ocorre na zona pelúcida após a ligação do espermatozoide. A reação acrossômica induzida pela zona pelúcida pode ser avaliada em espermatozoides removidos da superfície da zona pelúcida ou expostos a proteínas de zonas pelúcidas humanas desagregadas (Liu & Baker, 1994, 1996; Franken et al., 2000). Em casos de teratozoospermia e oligozoospermia, alguns homens podem ter análises normais de sêmen, exceto pelos espermatozoides que exibem reações acrossômicas bagunçadas induzidas pela zona pelúcida. Outros podem ter espermatozoides que exibem ligação normal na zona pelúcida, mas apresentam uma reação acrossômica pobre induzida por zona pelúcida (Liu et al., 2004). Estes testes são limitados pela disponibilidade restrita de zona pelúcida humana. Zona pelúcida de outros primatas não pode ser usada como substituto por causa da sua especificidade de ligação restrita (Bedford, 1977; Liu et al., 1991b; Oehninger et al., 1993). Outros estímulos, como os ionóforos de cálcio, induzirão a reação acrossômica, mas os resultados não estão relacionados àqueles obtidos da reação acrossômica induzida pela zona pelúcida (Liu & Baker, 1996). O estado acrossômico após a indução da reação acrossômica pode ser avaliado por microscopia ou citometria de fluxo (Fenichel et al., 1989; Henley et al., 1994; Cooper & Yeung, 1998) com lectinas marcadas fluorescentemente, como *Pisum sativum* (aglutinina de ervilha) (ver Seção 4.4.1) ou *Arachis hypogaea* (lectina do amendoim), ou anticorpos monoclonais contra o antígeno acrossômico CD46 (Cross, 1995).

4.4.1 Procedimento para a avaliação da fluorescência do estado acrossomal

O método foi originalmente desenvolvido por Cross et al. (1986) e subsequentemente modificado por Liu e Baker (1988). O procedimento modificado é mais simples, reproduzível e produz imagens muito claras (Fig. 4.3). É preferível usar uma preparação de esperma altamente móvel, livre de contaminantes como leucócitos, células germinativas e espermatozoides mortos. Assim, ou a amostra deve ser lavada (ver Seção 5.3), ou submetida a “swim-up” (ver Seção 5.4) ou deve-se fazer uma preparação com gradientes de densidade (ver Seção 5.5), dependendo da qualidade da amostra.

4.4.1.1 Reagentes

1. Aglutinina *Pisum sativum* (PSA) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (PSA-FITC).
2. Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4.
3. NaCl, 0,9% (9 g/l): dissolver 0,9 g de NaCl em 100 ml de água purificada.
4. Etanol 95% (v/v).
5. Solução padrão de PSA: diluir 2 mg de PSA-FITC em 4 ml de PBS. Armazenar alíquotas de 0,5 ml a -20°C .
6. Solução de trabalho de PSA: diluir 0,5 ml de solução de reserva de PSA em 10 ml de PBS e armazenar a 4°C . Esta solução é estável por até 4 semanas.

4.4.1.2 Lavagem simples de espermatozoides

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3) e remover uma alíquota de cerca de 0,2 ml.
2. Diluir a 10 ml com solução salina a 0,9% (9 g/l).
3. Centrifugar a 800g por 10 minutos.
4. Desmontar e descartar todo, exceto 20 a 40 μl , o sobrenadante.
5. Ressuspender o sedimento de esperma no sobrenadante restante por meio de pipetagem suave.
6. Repetir o procedimento de lavagem.

4.4.1.3 Tratar preparações de esperma purificadas

1. Diluir o “swim-up” (ver Seção 5.4) ou preparações de gradiente de densidade lavadas uma vez (ver Seção 5.5) a 10 ml com solução salina.
2. Centrifugar a 800g por 10 minutos.
3. Desmontar e descartar todo, exceto 20 a 40 μl , o sobrenadante.

4. Ressuspender o sedimento de esperma no sobrenadante restante por meio de pipetagem suave.

4.4.1.4 Preparando um esfregaço

1. Preparar esfregaços replicados de espermatozoides de cerca de 1 cm de comprimento a partir de 5 µl de suspensão.
2. Inspeccionar os esfregaços úmidos por microscopia de contraste de fase (×400).
3. Assegure-se de que os espermatozoides estejam distribuídos uniformemente nas corrediças sem aglomerar.
4. Deixar as lâminas secarem ao ar.
5. Fixar em etanol a 95% (v/v) por 30 minutos.
6. Deixar secar ao ar.

4.4.1.5 Corando com PSA–FITC

1. Despejar 10 ml de solução de trabalho PSA-FITC em um frasco de coloração vertical.
2. Mergulhar as lâminas fixadas e secas ao ar no corante PSA-FITC.
3. Deixar corar por mais de 1 hora a 4 °C.
4. Lavar cada lâmina com água purificada e montar em meio solúvel de etanol (ver Seções 2.14.2.4 e 2.14.2.5).

Nota: Tempos de coloração mais longos (até 18 horas) não afetarão os resultados da PSA. Tempos mais curtos (menos de 1 hora) dificultarão a avaliação da lâmina.

4.4.1.6 Pontuação

Veja a lâmina com óptica de fluorescência, com uma ampliação de × 400 e imersão em óleo, a um comprimento de onda de 450–490 nm. Categorize os espermatozoides da seguinte forma.

1. Acrossomo intacto (AI): espermatozoides nos quais mais da metade da cabeça é brilhante e uniformemente fluorescente (ver Fig 4.3).
2. Acrossomo reagido (AR): espermatozoides com apenas uma faixa fluorescente no segmento equatorial ou nenhuma mancha fluorescente na região acrossômica (ver Fig. 4.3).
3. Acrossomas anormais: todos os outros espermatozoides.

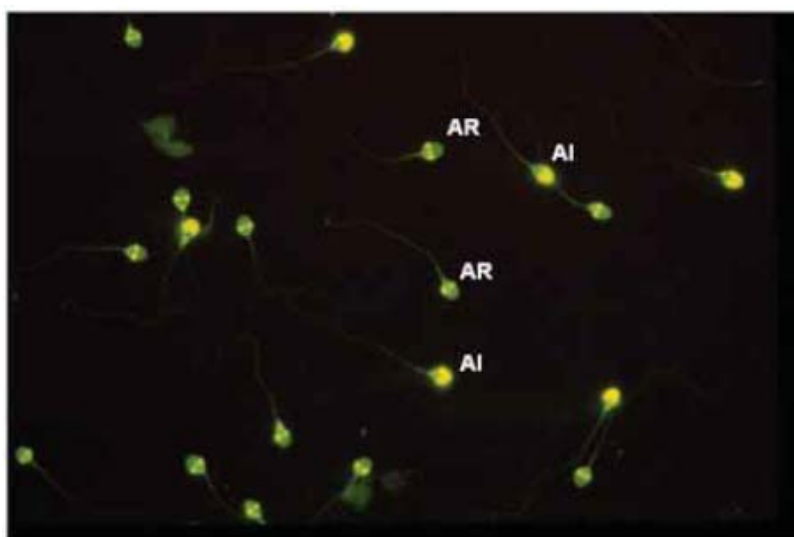
4.4.1.7 Contando espermatozoides com acrossomo reagido

1. Registrar o número em cada categoria acrossomal (AI e AR) com o auxílio de um contador de laboratório.

2. Avaliar 200 espermatozoides em cada réplica, a fim de obter um erro de amostragem aceitavelmente baixo (ver Quadro 2.5).
3. Calcular a média e a diferença das duas porcentagens de espermatozoides com acrossomo reagido das lâminas replicadas.
4. Determinar a aceitabilidade da diferença da Tabela 2.1 ou da Figura A7.2, Apêndice 7. (Cada uma mostra a diferença máxima entre duas porcentagens que se espera que ocorra em 95% das amostras devido ao erro de amostragem isolado).
5. Se a diferença entre as porcentagens for aceitável, relatar a porcentagem média de espermatozoides com acrossomo reagido. Se a diferença for muito alta, reavaliar as duas lâminas (ver o Quadro 2.6).
6. Relatar a porcentagem de espermatozoides com acrossomo reagido para o número inteiro mais próximo.

Fig. 4.3 Coloração de espermatozoides humanos com aglutinina *Pisum sativum* fluorescente (PSA)

Podem-se observar espermatozoides AI, com cabeças proximais coradas (acrossoma), e espermatozoides AR, com bandas equatoriais coradas ou regiões pós-acrossomais.



Micrografia cortesia de HWG Baker.

4.4.2 Ensaio de reação acrossômica induzida

A reação acrossômica é um processo excitatório que ocorre após os espermatozoides se ligarem à zona pelúcida e deve ocorrer antes que o espermatozoide possa penetrar no oócito e se fundir com ele. Acredita-se que o influxo de cálcio seja um evento inicial na reação acrossômica normal. Induzir o influxo de cálcio usando um ionóforo de cálcio é uma forma de testar a competência dos espermatozoides capacitados para sofrer a reação acrossômica (Aitken et al., 1993). Esta é a base deste ensaio, também chamado de reação acrossômica após teste com desafio de ionóforo (ARIC). No entanto, é necessária

uma avaliação adicional antes que o teste de status de acrossomo possa ser considerado um ensaio clínico de rotina.

4.4.2.1 Reagentes

1. Meio F-10 de Ham (ver Apêndice 4, seção A4.4) contendo 3,5% (35 g/l) de albumina sérica humana (HSA).
2. Solução de estoque de Biggers, Whitten e Whittingham (BWW): consulte o Apêndice 4, seção A4.1.
3. Sulfóxido de dimetilo (DMSO).
4. Ionóforo A23187, solução padrão a 1 mmol/l: dissolver 5,23 mg de A23187 em 10 ml de DMSO.
5. Glutaraldeído a 3% (v/v) ou etanol 70% (v/v).

4.4.2.2 Procedimento

1. Aguardar de 30 a 60 minutos para a liquefação completa do sêmen fresco.
2. Preparar o meio de indução de capacitação F-10-HSA de Ham, fresco para cada ensaio.
3. Aquecer o meio a 37 °C antes de usar, de preferência em uma incubadora de 5% (v/v) de CO₂ no ar.
4. Preparar uma população de espermatozoides altamente móvel, livre de contaminantes como leucócitos, células germinativas e espermatozoides mortos, por meio de centrifugação em gradiente de densidade (veja a Seção 5.5), usando meio Ham F-10 HSA fresco.
5. Preparar o controle e replicar os tubos experimentais, cada um contendo aproximadamente 1 ml de suspensão com 1×10^6 espermatozoides móveis.
6. Incubar as suspensões de espermatozoides por 3 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% (v/v) de CO₂ no ar para induzir a capacitação (soltar a tampa do tubo para permitir a troca de gás). Se não estiver disponível uma incubadora de CO₂, utilizar um meio tamponado com Hepes (ver Apêndice 4, seção A4.1, Nota 1), tampar bem os tubos e incubar a 37 °C.
7. Adicionar 10 µl de solução estoque A23187 (1 mmol/l) aos tubos experimentais replicados para obter uma concentração final de 10 µmol/l.
8. Adicionar 10 µl de DMSO ao tubo de controle.
9. Incubar todos os tubos a 37 °C por 15 minutos.
10. Remover uma pequena alíquota de cada tubo para determinar a motilidade.
11. Parar a reação adicionando 100 µl de glutaraldeído a 3% (v/v) ou etanol a 70% (v/v).

12. Transferir os espermatozoides fixos para lâminas de microscópio pré-limpas e deixar secar ao ar.
13. Fazer a coloração dos espermatozoides usando corante fluorescente (ver Seção 4.4.1.5).
14. Avaliar por microscopia de fluorescência com ampliação de $\times 400$ com imersão em óleo a um comprimento de onda de 450–490 nm.
15. Avaliar a porcentagem de espermatozoides com reação acrossômica nas amostras experimentais (teste %AR) e nas amostras de controle (controle %AR).

4.4.2.3 Pontuação

1. A reação acrossômica após o desafio com ionóforo (ARIC) é o teste %AR menos o controle %AR.
2. A diferença normal é de aproximadamente 15% AR.
3. Valores abaixo de 10% AR são considerados anormais.
4. Valores entre 10% AR e 15% AR sugerem que a função espermática pode ser anormal.
5. Valores de controle acima de 15% indicam um AR espontâneo e prematuro.

4.4.2.4 Controle de qualidade

1. Uma amostra de controle positivo (o sêmen de um homem cujos espermatozoides tinham anteriormente respondido bem ao ionóforo ($> 15\%$ AR)) deve ser executado sempre que o teste é realizado.
2. Cada vez que um novo lote de coloração é preparado, realize um teste cruzado com o corante antigo, usando espermatozoides de controle positivo com uma resposta conhecida, para garantir que a coloração tenha sido feita adequadamente.

4.5 Teste de penetração de oócitos de hamster sem zona

A fusão de espermatozoides humanos ao oócito de hamster é funcionalmente a mesma que a da membrana vitelina humana, uma vez que é iniciada pela membrana plasmática que recobre o segmento equatorial de espermatozoides humanos reagidos com acrossomo. O teste de penetração de oócitos de hamster (HOP), ou ensaio de penetração espermática, difere da situação fisiológica em que a zona pelúcida está ausente. Um protocolo padrão para este teste é dado abaixo.

Comentário: O teste convencional de oócitos de hamster depende da ocorrência de reações acrossomais espontâneas em populações de espermatozoides incubados por períodos prolongados in vitro. Como esse procedimento é menos eficiente que o processo biológico e pode envolver mecanismos diferentes, resultados falso-negativos (cujos espermatozoides falharam no teste de oócitos de hamster, mas fertilizaram com sucesso oócitos humanos in vitro ou in vivo) têm sido informados com frequência (OMS, 1986). Apesar dessa potencial limitação confusa, o teste fornece informações sobre a natureza fusinogênica das membranas capacitadas da cabeça do espermatozoide.

Dois dos principais sinais intracelulares que iniciam a reação acrossômica após a interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida são uma influência da alcalinização do cálcio e do citoplasma. Como ambos podem ser gerados artificialmente com um ionóforo de cátion bivalente (Aitken et al., 1993), um método alternativo usando espermatozoides estimulados por ionóforos também é descrito.

4.5.1 Protocolo

4.5.1.1 Reagentes

1. Solução padrão BWV: consulte o Apêndice 4, seção A4.1.
2. Hialuronidase (300–500 UI/mg).
3. Tripsina tipo I (10.000 BAEE U/mg).
4. Cera (ponto de fusão 48–66 °C).
5. Vaselina.
6. Óleo mineral.
7. Oócitos de hamster sem zona: podem ser adquiridos comercialmente ou obtidos por superovulação de hamsters (ver Quadro 4.1).
8. Sulfóxido de dimetilo (DMSO).
9. Ionóforo (para protocolo alternativo) solução padrão 1 mmol/l: dissolver 5,23 mg do ionóforo divalente A23187 em 10 ml DMSO.

4.5.1.2 Protocolo padrão que não incorpora o ionóforo como desafio

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Preparar amostras de sêmen por centrifugação com gradiente de densidade ou por “swim-up” (veja a Seção 5.4).
3. Remover a maior parte do sobrenadante do sedimento.
4. Soltar o sedimento por pipetagem suave e estabelecer a concentração de espermatozoides no sedimento (ver Seções 2.7 e 2.8).
5. Diluir o sedimento, levando-o, aproximadamente, a 10×10^6 espermatozoides por ml em aproximadamente 0,5 ml de meio.
6. Inclinar o tubo em um ângulo de 45° para a horizontal para aumentar a área de superfície.
7. Incubar as suspensões de espermatozoides por 18–24 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% (v/v) de CO₂ no ar para induzir a capacitação (soltar a tampa do tubo para permitir a troca de gás). Se não estiver disponível uma incubadora de CO₂, utilizar um meio tamponado com Hepes (ver Apêndice 4, seção A4.1, Nota 1), tampar bem os tubos e incubar a 37 °C.

8. Retornar os tubos para a posição vertical por 20 minutos para permitir a acomodação de qualquer célula imóvel após a capacitação.
9. Aspirar espermatozoides móveis a partir do terço superior do sobrenadante, tomando cuidado para não perturbar os espermatozoides mortos na interface e transferi-los para o novo tubo.
10. Ajustar a concentração para $3,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis por ml de meio.
11. Com uma pipeta de deslocamento positivo, aspirar volumes conhecidos (50-150 μ l) de suspensão de espermatozoides e distribuí-los lentamente em uma pequena placa de Petri. Com uma pipeta descartável de plástico, cobrir a gota com óleo mineral pré-aquecido, equilibrado em CO_2 , tomando cuidado para não perturbar a suspensão espermática. Adicionar óleo suficiente para envolver e cobrir apenas cada gota de espermatozoides.

4.5.1.3 Protocolo alternativo que incorpora um ionóforo de cálcio (Ca^{2+})

1. Preparar uma população de espermatozoides altamente móveis por centrifugação por gradiente de densidade, conforme descrito na Seção 5.5.
2. Aspirar o sedimento no fundo da fração de meio de gradiente de densidade a 80% e transferi-lo para 8 ml de BWW.
3. Centrifugar a 500g por 5 minutos.
4. Decantar a maior parte do sobrenadante do sedimento e soltar o sedimento por pipetagem suave.
5. Estabelecer a concentração de espermatozoides no sedimento (ver Seções 2.7 e 2.8) e diluir para aproximadamente 5×10^6 espermatozoides móveis por ml de BWW fresco.
6. Adicionar 1,25 e 2,5 μ l de solução padrão A23187 (1 mmol/l) para separar alíquotas de 1 ml da suspensão espermática, para atingir duas concentrações finais de 1,25 e 2,5 μ mol/l, respectivamente.
7. Incubar os espermatozoides com o ionóforo por 3 horas a 37 °C.
8. Centrifugar as células a 500g por 5 minutos.
9. Decantar a maior parte do sobrenadante do sedimento e soltar o sedimento por pipetagem suave.
10. Avaliar a porcentagem de espermatozoides móveis.
11. Diluir para aproximadamente $3,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis por ml BWW fresco. Resultados válidos ainda podem ser obtidos usando concentrações tão baixas quanto 1×10^6 espermatozoides móveis por ml (Aitken & Elton, 1986).
12. Disperse espermatozoides sob óleo mineral, conforme descrito em 4.5.1.2, passo 11.

Nota: A curva dose-resposta para o tratamento com ionóforo varia entre os indivíduos, por isso é preferível testar ambas as concentrações de ionóforos.

Quadro 4.1 Indução da ovulação em hamsters

Garantir que todos os requisitos legais para a injeção de animais vivos sejam atendidos. Preparar soluções da dose apropriada de gonadotrofina sérica de égua grávida (PMSG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG). Dispensar em pequenos frascos. Armazenar a -20°C até o uso. Injetar hamsters imaturos, ou hamsters maduros no dia 1 do ciclo estral, intraperitonealmente (i.p.) com 30 UI de PMSG. Após 48-72 horas, injetá-los com 40 UI de hCG (i.p.). Segurar as costas do animal e puxar a pele abdominal esticada sobre a barriga com uma mão; com a outra mão, administrar o hormônio na cavidade abdominal (logo acima das articulações do quadril) com uma seringa de 1 ml através de uma agulha de calibre 21. Trocar as agulhas entre os animais para garantir uma penetração fácil na pele e um mínimo desconforto para os animais.

4.5.1.4 Coletando os ovários

1. Recuperar os oócitos dentro das 18 horas após a injeção de hCG, sacrificando os animais de acordo com os métodos aprovados pelo comitê de cuidados e uso de animais.
2. Colocar os hamsters de costas e umedecer a pele abdominal com etanol a 95% (v/v).
3. Segurar a pele com uma pinça dentada e cortar a pele e o músculo com uma tesoura para expor o útero e os ovários.
4. Limpar os pelos da pinça e da tesoura com etanol a 95% (v/v).
5. Empurrar os intestinos para fora da cavidade abdominal para expor os cornos uterinos.
6. Segurar um corno com a pinça e retirá-lo da cavidade abdominal para expor o oviduto, o ovário e o ligamento ovariano.
7. Segurar a porção mais distal do corno com a pinça e cortar a ponta do útero logo abaixo da pinça. Cortar o ovário e colocá-lo em BWW quente (37°C) em uma pequena placa de Petri.
8. Recolher o segundo ovário da mesma maneira.

4.5.1.5 Coletando as massas de cumulus

1. Examinar os ovários por transiluminação em um microscópio de dissecação para localizar as células do cumulus contendo os oócitos na porção inchada do oviduto.
2. Segurar o oviduto com uma pinça e perfurar a área inchada com uma agulha de calibre 21. A massa do cumulus vai sair pelo buraco da punção.
3. Tirar a massa do cumulus com a agulha. Espremer o oviduto com a pinça para remover toda a massa do cúmulo.

4.5.1.6 Recuperando e tratando os oócitos

1. Reunir as células do cumulus com a agulha e o fórceps e colocá-las em um vidro de relógio, placa de toque ou outro recipiente raso contendo 0,1% (1 g/l) de hialuronidase (300–500 UI/ml) em BWW aquecido e equilibrado com CO₂.
2. Incubar o recipiente, coberto com papel alumínio para proteger as células da luz, por 10 minutos à temperatura ambiente. Observar a separação das células do cumulus em um microscópio de dissecação.
3. Utilizar uma pipeta de vidro (ver Quadro 4.2) para transferir os oócitos libertados da hialuronidase para o BWW equilibrado e quente.
4. Lavar os oócitos recuperados duas vezes em BWW, transferindo-os para novas gotas de BWW quente e equilibrado. Isso pode ser feito em um prato multipoços de vidro ou em uma placa de toque. Lavar a pipeta com BWW entre cada transferência de oócitos.
5. Tratar os oócitos com 0,1% (1 g/l) de tripsina (10.000 UI/ml) por aproximadamente 1 minuto à temperatura ambiente para remover a zona pelúcida. Observar a digestão da zona em um microscópio de dissecação e remover os oócitos assim que a zona se dissolver.
6. Lavar os oócitos com BWW mais três vezes.
7. Aquecer os oócitos isolados a 37 °C e introduzi-los nas suspensões de espermatozoides. Alternativamente, eles podem ser armazenados a 4 °C por até 24 horas antes do uso.

Quadro 4.2 Preparação de pipetas de vidro

Girar um tubo capilar de vidro ou uma pipeta Pasteur logo acima da chama de um bico de Bunsen, segurando as extremidades do tubo de vidro com as duas mãos e rolando-o para frente e para trás sobre a chama para garantir o aquecimento uniforme do vidro. Assim que o vidro começar a derreter, puxar suas mãos rapidamente para esticá-lo. Soltar o fio de vidro como a largura desejada (aproximadamente 1 mm) da abertura da pipeta. Anexar a extremidade não estirada da pipeta a uma seringa de 1 ml com tubo.

4.5.1.7 Coincubação de gametas

1. Dispensar os oócitos de hamster sem zonas em várias gotículas, com cerca de cinco oócitos por gota (isto é, para 20 oócitos por amostra de sêmen, preparar quatro alíquotas de cinco oócitos por gota).
2. Carregar grupos de cerca de cinco oócitos na pipeta de vidro com pouco meio para não diluir as suspensões de esperma em demasia.
3. Inserir a ponta da pipeta diretamente no centro de uma gota de suspensão espermática e, lentamente, dispensar os oócitos. Manter pressão positiva para evitar que o óleo mineral entre na pipeta e ter cuidado para não introduzir bolhas de ar na suspensão de espermatozoides.
4. Limpar o excesso de óleo da ponta da pipeta após a remoção da suspensão de esperma.
5. Repetir o passo 3 até que todos os oócitos tenham sido transferidos para as suspensões de espermatozoides.

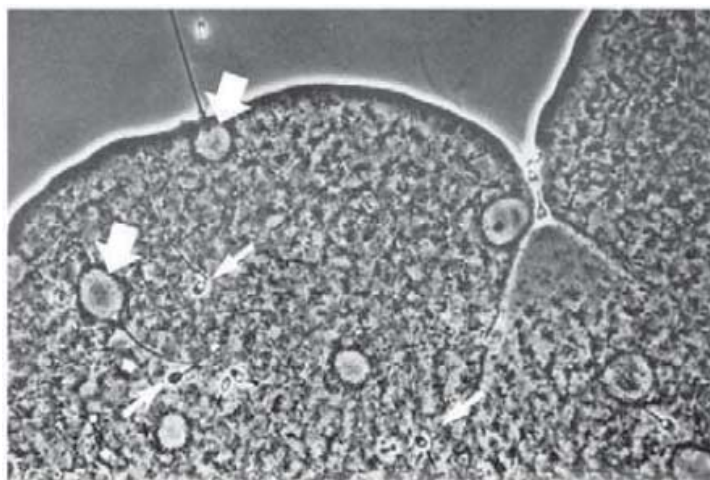
6. Lavar a pipeta completamente em BWW após cada transferência de óvulos para evitar a contaminação cruzada dos espermatozoides.
7. Incubar os gametas por 3 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% (v/v) de CO₂ no ar.
8. Recuperar os oócitos das gotículas de óleo. Tomar cuidado para limpar qualquer óleo da ponta da pipeta antes de transferir os oócitos para a BWW.
9. Lavar os oócitos livres de espermatozoides com a pipeta Pasteur feita na chama, enxaguando com BWW.

4.5.1.8 Analisando os oócitos

1. Colocar quatro pilares feitos com uma mistura de cera e vaselina (ver Quadro 3.1) em um padrão retangular para apoiar a lamínula (22 mm × 22 mm, espessura número 1,5, 0,17 mm) em seus cantos.
2. Colocar uma pequena gota de BWW, contendo oócitos, no centro dos quatro pilares.
3. Abaixar a lamínula sobre os pilares de cera e pressionar suavemente para baixo, para começar a achatar os oócitos. Um oócito bem achatado é necessário para a observação ideal de cabeças de espermatozoides descondensadas.
4. Se necessário, adicionar mais BWW para inundar a lâmina, para evitar o esmagamento dos oócitos.
5. Examinar a preparação por microscopia de contraste de fase com ampliação de 200x.
6. Contar o número de cabeças de esperma descondensadas com cauda ligada ou intimamente associada (ver Fig. 4.4).
7. Registrar a porcentagem de oócitos penetrados por pelo menos um espermatozoide e o número de espermatozoides por oócito penetrado.
8. Registrar a presença de quaisquer espermatozoides que permaneçam ligados à superfície do oócito após o procedimento de lavagem inicial, pois isso pode dar alguma indicação da proporção da população de espermatozoides que sofreu a reação acrossômica.

Fig. 4.4 Micrografia de contraste de fase de um oócito de hamster sem zona contendo espermatozoides humanos

As setas largas indicam a presença de cabeças de espermatozoides descondensadas dentro do ooplasma; as setas estreitas apontam para espermatozoides que não penetraram a superfície do oócito.



Reproduzido de Aitken et al. (1983) com a gentil permissão de Springer Science + Business Media.

4.5.1.9 Controle de qualidade

Os ensaios devem ser realizados com uma amostra de sêmen de controle positivo, exibindo > 50% de penetração.

4.6 Avaliação da cromatina espermática

Vários métodos têm sido usados para testar a normalidade da cromatina e o DNA do espermatozoide. Todos eles usam corantes que se ligam à histona (anilina azul) ou ao ácido nucléico (laranja de acridina, cromomicina) e são avaliados histologicamente ou por citometria de fluxo. Métodos mais recentes incluem aqueles baseados na avaliação de quebras na fita de DNA, como desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) mediado pela desoxiuridina trifosfato (dUTP) - nick-end labelling (ou TUNEL (in situ end-labeling, ISEL)), teste cometa ou dispersão de cromatina de esperma (SCD). Os resultados desses testes estão correlacionados entre si (Chohan et al., 2006) e com a morfologia, motilidade e viabilidade dos espermatozoides. Eles podem fornecer informações adicionais sobre as taxas de fertilização com IVF padrão e, possivelmente, taxas de gravidez espontânea. O ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) pode ser preditivo de falha na fertilização in vivo e in vitro (Evenson & Wixon, 2006). Se existe alguma relação entre os resultados desses testes e aborto, ou outros resultados da gravidez, ainda não está claro.

PARTE II.

Preparação de esperma

CAPÍTULO 5 Técnicas de preparação de esperma

5.1 Introdução

Os espermatozoides poderão ser separados do plasma seminal para uma variedade de propósitos, como testes diagnósticos de função, e recuperação terapêutica para inseminação, e tecnologias de reprodução assistida (ART). Se forem realizados testes de função espermática, é essencial que os espermatozoides sejam separados do plasma seminal dentro de 1 hora após a ejaculação, para limitar qualquer dano causado por produtos de células não espermáticas.

Comentário 1: A contagem de poucos espermatozoides produzirá um resultado incerto (consulte o Apêndice 7, seção A7.1.1), que pode ter consequências para o diagnóstico e a terapia (consulte o Apêndice 7, seção A7.2). Isso pode ser inevitável quando os espermatozoides são necessários para fins terapêuticos e poucos estão disponíveis.

Comentário 2: Quando menores volumes de sêmen são retirados e menos espermatozoides são contados do que o recomendado, a precisão dos valores obtidos será significativamente reduzida. Quando são encontrados menos de 400 espermatozoides, relatar o erro de amostragem para o número de células contadas (ver Tabela 2.2).

5.1.1 Separação dos espermatozoides do plasma seminal

Embora o plasma seminal ajude os espermatozoides a penetrar o muco cervical (Overstreet et al., 1980), alguns de seus componentes (ex. Prostaglandinas, zinco) são obstáculos para a gravidez quando barreiras naturais são contornadas na ART, como a inseminação intrauterina (IUI) ou fertilização in vitro (IVF). A separação de espermatozoides humanos do plasma seminal para produzir uma preparação final contendo uma alta porcentagem de células morfolologicamente normais e móveis, livres de detritos, células não germinativas e espermatozoides mortos, é importante para a prática clínica. A diluição do sêmen com meio de cultura e centrifugação ainda é usada para a preparação de amostras normozoospermicas para IUI (Boomsma et al., 2004). No entanto, a centrifugação por gradiente de densidade e “swim-up” direto são geralmente preferidos para amostras com uma ou mais anormalidades nos parâmetros do sêmen (ver, por exemplo, Morshedi et al., 2003). As colunas de lã de vidro são relatadas tão eficazes quanto os gradientes de densidade para a separação dos espermatozoides do sêmen com características subótimas (Rhemrev et al., 1989; Johnson et al., 1996).

5.1.2 Escolha do método

A escolha da técnica de preparação de esperma é ditada pela natureza da amostra de sêmen (ver Canale et al., 1994). Por exemplo, a técnica “swim-up” direta é frequentemente usada quando as amostras de sêmen são consideradas normais, enquanto em casos de oligozoospermia grave, teratozoospermia ou astenozoospermia, os gradientes de densidade são geralmente preferidos devido ao maior número total de espermatozoides móveis recuperados. Gradientes de densidade também podem ser alterados para otimizar o manuseio de propriedades específicas de amostras individuais: o volume total de material de gradiente pode ser reduzido, limitando a distância que os espermatozoides migram e maximizando a recuperação total de espermatozoides móveis ou o tempo de centrifugação pode ser aumentado para amostras com alta viscosidade.

Cada laboratório deve determinar a força centrífuga e o tempo de centrifugação necessário para formar um sedimento de espermatozoides manejável. Quando o número de espermatozoides é extremamente baixo, pode ser necessário modificar a força centrífuga ou o tempo, a fim de aumentar as chances de recuperar o número máximo de espermatozoides. Modificações nos tempos recomendados e forças centrífugas devem ser rigorosamente testadas antes da implementação clínica. O método de preparação mais adequado pode ser identificado a partir da capacidade funcional dos espermatozoides preparados, como determinado, por exemplo, pelo teste de penetração de oócitos em hamster sem zona (ver Seção 4.5).

5.1.3 Eficiência da separação de espermatozoides do plasma seminal e organismos contagiosos

A eficiência de uma técnica de seleção de espermatozoides é geralmente expressa como o número de espermatozoides absolutos, o número total de espermatozoides móveis, ou a recuperação de espermatozoides móveis morfológicamente normais. A “swim-up” geralmente produz uma recuperação mais baixa de espermatozoides móveis (< 20%) do que a centrifugação por gradiente de densidade (> 20%) (mas ver Ng et al., 1992). A centrifugação de gradiente de densidade e “swim-up” também produzem diferentes níveis de contaminação com componentes seminais na preparação final dos espermatozoides. Usando a secreção prostática de zinco como marcador de componentes seminais solúveis, Björndahl et al. (2005) demonstraram a difusão de zinco dependente do tempo de sêmen dentro de um meio “swim-up” sobreposto. A concentração final de zinco nas preparações submersas foi maior que após a preparação do gradiente de densidade.

As amostras de sêmen podem conter agentes infecciosos nocivos e os técnicos devem tratá-los como um risco biológico, com extremo cuidado. As técnicas de preparação de espermatozoides não podem ser consideradas 100% eficazes na remoção de agentes infecciosos do sêmen (ver Seção 5.6). As diretrizes de segurança, conforme descrito no Apêndice 2, devem ser estritamente observadas. Boas práticas de laboratório são fundamentais para a segurança laboratorial (OMS, 2004).

5.2 Princípios gerais

Três técnicas simples de preparação de espermatozoides são descritas nas seções seguintes. Para todas elas, o meio de cultura sugerido é uma solução salina balanceada suplementada com proteína e contendo um tampão apropriado para as condições ambientais em que os espermatozoides serão processados. Para procedimentos de reprodução assistida, como injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), fertilização in vitro (IVF), inseminação artificial (AI) ou transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), é imperativo que a albumina sérica humana esteja altamente purificada e livre de vírus, contaminação bacteriana e prionica. Albuminas criadas especificamente para esses procedimentos estão comercialmente disponíveis. Se a incubadora contiver apenas ar atmosférico e a temperatura for de 37 °C, o meio deve ser tamponado com Hepes ou um tampão semelhante, e as tampas dos tubos devem estar bem fechadas. Se a atmosfera da incubadora for 5% (v/v) de CO₂ no ar e a temperatura for de 37 °C, então o meio é mais bem tamponado com bicarbonato de sódio ou um tampão semelhante, e as tampas dos tubos de ensaio devem estar soltas para permitir troca gasosa. A adesão a isto garantirá que o pH da cultura seja compatível com a sobrevivência espermática. A disposição final dos espermatozoides processados determinará

qual meio tamponado é apropriado. Por exemplo, os testes da função espermática, em geral, exigirão um meio que suporte a capacitação espermática e, normalmente, contenha bicarbonato de sódio (25 mmol/l).

O sêmen deve ser coletado de maneira estéril (ver Seção 2.2.3). Técnicas e materiais estéreis são essenciais na aplicação de uma técnica de preparação de espermatozoides para aplicações terapêuticas.

5.3 Lavagem simples

Este procedimento de lavagem simples fornece o maior rendimento de espermatozoides e é adequado se as amostras de sêmen forem de boa qualidade. É frequentemente usado para preparar os espermatozoides para IUI.

5.3.1 Reagentes

1. BWW, Earle, Ham F-10 ou líquido tubário humano (HTF) (disponível no comércio ou ver Apêndice 4, seções A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) suplementado preferencialmente com albumina de soro humano (HSA), ou soro, como descrito abaixo.
2. HSA, altamente purificado e livre de contaminação, viral, bacteriana e priônica, e endotoxinas.
3. Suplemento de HSA: para 50 ml de meio, adicionar 300 mg de HSA, 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de xarope de lactato de sódio (60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.
4. Suplemento de soro: para 46 ml de meio, adicionar 4 ml de soro do cliente inativado pelo calor (56 °C durante 20 minutos), 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de lactato de sódio (xarope a 60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.

5.3.2 Procedimento

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Diluir toda a amostra de sêmen 1 + 1 (1: 2) com meio suplementado para promover a remoção do plasma seminal.
3. Transferir a suspensão diluída para vários tubos de centrifugação, preferencialmente não mais de 3 ml por tubo.
4. Centrifugar a 300–500g por 5–10 minutos.
5. Aspirar cuidadosamente e descartar os sobrenadantes.
6. Ressuspender o sedimento de espermatozoides combinado em 1 ml de meio suplementado por meio de pipetagem suave.
7. Centrifugar novamente a 300–500g por 3–5 minutos.
8. Aspirar cuidadosamente e descartar os sobrenadantes.

9. Ressuspender o sedimento de esperma, por pipetagem suave, em um volume de meio suplementado apropriado para disposição final, por ex. inseminação, de modo que a concentração e a motilidade possam ser determinadas (ver Seções 2.5 e 2.7).

Nota: O número de lavagens para remover o plasma seminal pode ser reduzido usando menos tubos e aumentando o volume em cada tubo. Se isto for feito, a força centrífuga e a duração da centrifugação devem ser aumentadas, para assegurar uma sedimentação completa dos espermatozoides, por ex. 500 a 600 g por 8 a 10 minutos.

5.4 “Swim-up” (Capacitação Espermática) direto

Os espermatozoides podem ser selecionados pela capacidade de nadar para fora do plasma seminal e entrar no meio de cultura. Isso é conhecido como a técnica “swim-up”. O sêmen, de preferência, não deve ser diluído e centrifugado antes do teste, porque isso pode resultar em danos peroxidativos às membranas espermáticas (Aitken & Clarkson, 1988). Assim, um banho direto de espermatozoides a partir do sêmen é o método preferido para separar os espermatozoides móveis (ver, por exemplo, Mortimer, 1994a, b). A técnica direta de “swim-up” pode ser realizada por meio de camadas de meio de cultura sobre o sêmen liquefeito ou por sêmen liquefeito em camadas sob o meio de cultura. Os espermatozoides móveis então nadam para o meio de cultura. Este procedimento oferece um menor rendimento de espermatozoides do que a lavagem, mas os seleciona pela sua motilidade e é útil quando a percentagem de espermatozoides móveis no sêmen é baixa, por ex. para IVF e ICSI.

5.4.1 Reagentes

1. BWW, Earle, Ham F-10 ou HTF (ver Apêndice 4, seções A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) suplementado preferencialmente com HSA, ou soro, como descrito abaixo.
2. HSA, altamente purificado e livre de contaminação, viral, bacteriana e priônica, e endotoxinas.
3. Suplemento de HSA: para 50 ml de meio, adicionar 300 mg de HSA, 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de xarope de lactato de sódio (60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.
4. Suplemento de soro: para 46 ml de meio, adicionar 4 ml de soro do cliente inativado pelo calor (56 °C durante 20 minutos), 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de lactato de sódio (xarope a 60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.

5.4.2 Procedimento

1. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
2. Colocar 1 ml de sêmen em um tubo de centrifuga cônico estéril de 15 ml e aplicar delicadamente 1,2 ml de meio suplementado sobre ele. Alternativamente, pipetar cuidadosamente o sêmen sob o meio de cultura suplementado.

3. Inclinar o tubo em um ângulo de cerca de 45°, para aumentar a área de superfície do meio de cultura de sêmen e incubar durante 1 hora a 37 °C.
4. Gentilmente, retornar o tubo para a posição vertical e remover o 1 ml de meio superior. Isto irá conter espermatozoides altamente móveis.
5. Diluir com 1,5 a 2,0 ml de meio suplementado.
6. Centrifugar a 300–500g por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender o sedimento de esperma em 0,5 ml de meio suplementado para avaliação da concentração espermática, motilidade total e motilidade progressiva (ver Seções 2.5 e 2.7).
8. O espécime pode ser usado diretamente para fins terapêuticos ou de pesquisa.

5.5 Gradientes de densidade descontínua

Gradientes descontínuos de densidade podem fornecer a melhor seleção de espermatozoides de boa qualidade, proporcionando uma boa separação de outros tipos de células e detritos. É mais fácil padronizar do que utilizar a técnica “swim-up” e, assim, os resultados são mais consistentes. Esta técnica é usada para recuperar e preparar espermatozoides para uso em IVF e ICSI.

Este método utiliza a centrifugação do plasma seminal sobre gradientes de densidade de sílica coloidal revestida com silano, que separa as células pela sua densidade. Além disso, os espermatozoides móveis nadam ativamente através do material de gradiente para formar um sedimento mole no fundo do tubo. Um método simples de preparação de gradiente de densidade descontínuo de dois passos é o mais amplamente aplicado, tipicamente com uma camada de topo de densidade de 40% (v/v) e uma camada inferior de densidade de 80% (v/v). A preparação de esperma usando centrifugação de gradiente de densidade geralmente resulta em uma fração de espermatozoides altamente móveis, livres de detritos, leucócitos contaminantes, células não germinativas e células germinativas degeneradas.

Um número de produtos comerciais está disponível para fazer gradientes de densidade adequados para processamento de sêmen. Esses produtos devem ser usados de acordo com as recomendações do fabricante. Qualquer desvio das recomendações procedimentais deve ser baseado em evidências. A maioria dos meios de gradiente de densidade contém componentes de massa molecular relativamente alta que possuem osmolalidade inerentemente baixa, então eles são geralmente preparados em meio isosmótico com fluidos do trato reprodutivo feminino.

5.5.1 Reagentes

1. BWW, Earle, Ham F-10 ou HTF (ver Apêndice 4, seções A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6) suplementado preferencialmente com HSA, ou soro, como descrito abaixo.
2. HSA, altamente purificado e livre de contaminação, viral, bacteriana e priônica, e endotoxinas.

3. Suplemento de HSA: para 50 ml de meio, adicionar 300 mg de HSA, 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de xarope de lactato de sódio (60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.
4. Suplemento de soro: para 46 ml de meio, adicionar 4 ml de soro do paciente inativado pelo calor (56 °C durante 30–45 minutos), 1,5 mg de piruvato de sódio, 0,18 ml de lactato de sódio (xarope a 60% (v/v)) e 100 mg de bicarbonato de sódio.
5. Meio de gradiente de densidade isotônica: para 10 ml de meio de cultura concentrado 10x (disponível comercialmente ou ver o Apêndice 4, seções A4.1, A4.3, A4.4 e A4.6), adicionar 90 ml de meio de gradiente de densidade, 300 mg de HSA, 3 mg de piruvato de sódio, 0,37 ml de lactato de sódio (xarope a 60% (v/v)) e 200 mg de bicarbonato de sódio.
6. Gradiente 80% (v/v): para 40 ml de meio gradiente isotônico, adicionar 10 ml de meio suplementado.
7. Gradiente 40% (v/v): para 20 ml de meio gradiente isotônico, adicionar 30 ml de meio suplementado.

Nota: Embora esses meios isotônicos de gradiente de densidade sejam frequentemente referidos como 100%, 80% e 40% (v/v), eles são realmente 90%, 72% e 36% (v/v).

5.5.2 Procedimento

1. Preparar o meio de gradiente de densidade num tubo de ensaio, colocando 1 ml de meio de gradiente de densidade a 40% (v/v) sobre 1 ml de meio de gradiente de densidade a 80% (v/v).
2. Misturar bem a amostra de sêmen (ver Quadro 2.3).
3. Colocar 1 ml de sêmen acima do meio de gradiente de densidade e centrifugar a 300–400g por 15–30 minutos. Mais de um tubo por amostra de sêmen pode ser usado, se necessário.
4. Remover a maior parte do sobrenadante do sedimento de esperma.
5. Ressuspender o sedimento de esperma em 5 ml de meio suplementado por meio de pipetagem suave (para ajudar a remoção do meio de gradiente de densidade contaminante) e centrifugar a 200g por 4 a 10 minutos.
6. Repetir o procedimento de lavagem (passos 4 e 5 acima).
7. Ressuspender o sedimento final em meio suplementado por pipetagem suave para que a concentração e motilidade possam ser determinadas (ver Seções 2.5 e 2.7).

5.6 Preparando amostras de sêmen infectadas com HIV

Se o vírus da imunodeficiência humana (HIV) estiver presente no sêmen, o RNA viral e o DNA pró-viral podem ser encontrados livres no plasma seminal e em células não espermáticas. Como os receptores do HIV (CD4, CCR5, CXCR4) são expressos apenas por células não espermáticas, uma combinação de

centrifugação em gradiente de densidade seguida de “swim-up” foi proposta como uma forma de prevenir a infecção de parceiras não infectadas (Gilling-Smith et al., 2006; Savasi et al., 2007). Estes procedimentos foram desenvolvidos para separar células não espermáticas infectadas pelo vírus e plasma seminal (no sobrenadante de gradiente de densidade) de espermatozoides móveis livres de HIV no “swim-up” (a partir do sedimento de gradiente de densidade). As amostras preparadas devem ser testadas por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) antes do uso, e somente amostras livres de HIV poderão ser usadas para ART. Embora os resultados até o momento sejam encorajadores, ainda há evidências insuficientes da eliminação do risco de infecção pelo HIV através da preparação de espermatozoides.

Nota: Esta técnica deve ser usada apenas em instalações seguras para minimizar o risco de contaminação cruzada de amostras livres de HIV (Gilling-Smith et al., 2005).

5.7 Preparando espermatozoides testiculares e epididimários

Os espermatozoides recuperados do tecido testicular e do epidídimo requerem um preparo especial.

A indicação típica para a aspiração do epidídimo é a azoospermia obstrutiva e não a disfunção testicular. Consequentemente, um número relativamente grande de espermatozoides pode ser colhido para fins terapêuticos. Os aspirados de epidídimo podem frequentemente ser obtidos com contaminação mínima de glóbulos vermelhos e células não germinativas, tornando o isolamento e a seleção de espermatozoides epididimais móveis relativamente simples. Se grandes números de espermatozoides do epidídimo forem obtidos, a centrifugação por gradiente de densidade é um método eficaz de prepará-los para seu uso subsequente (ver Seção 5.5). Se os números de espermatozoides forem baixos, pode ser realizada uma lavagem simples (ver Seção 5.3).

Os espermatozoides testiculares podem ser recuperados por biópsia aberta (com ou sem microdissecção) ou por biópsia por agulha percutânea. Amostras testiculares são invariavelmente contaminadas com células não germinativas e um grande número de glóbulos vermelhos, portanto são necessários passos adicionais para isolar uma preparação limpa de espermatozoides. Para liberar as espermátides alongadas, ligadas aos túbulos seminíferos (“espermatozoides testiculares”), são necessários métodos enzimáticos ou mecânicos. Os espermatozoides testiculares são preparados para ICSI, uma vez que o número de espermatozoides é baixo e sua motilidade é ruim.

5.7.1 Método enzimático

1. Incubar o tecido testicular com collagenase (por exemplo, 0,8 mg de *Clostridium histolyticum*, tipo 1A por ml de meio) por 1,5 a 2 horas a 37 °C, agitando a cada 30 minutos.
2. Centrifugar a 100g por 10 minutos e examinar o sedimento.

5.7.2 Método mecânico

1. Macerar o tecido testicular em meio de cultura com lamelas de vidro até produzir uma pasta fina de tecido dissociado.

2. Como alternativa, retirar as células dos túbulos seminíferos usando agulhas finas (presas a seringas de tuberculina descartáveis) dobradas paralelamente à base da placa de cultura.

5.7.3 Processando suspensões espermáticas para injeção intracitoplasmática de espermatozoides

1. Lavar as amostras obtidas adicionando 1,5 ml de meio de cultura.
2. Centrifugar a 300g por 8–10 minutos.
3. Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 0,5 ml de meio de cultura fresco.
4. Estimar a motilidade e o número de espermatozoides no sedimento. (Algumas amostras com um baixo número de espermatozoides podem precisar ser ressuspensas em um volume menor de meio).
5. Colocar uma gotícula de 5 a 10 µl de meio de cultura em uma placa de cultura.
6. Cobrir com óleo mineral (pré-equilibrado com CO₂).
7. Introduzir 5–10 µl da suspensão de espermatozoides no meio de cultura.
8. Aspirar cuidadosamente os espermatozoides móveis encontrados na interface, entre o meio de cultura e o óleo, com uma pipeta ICSI.
9. Transferi-los para uma gota de solução viscosa, por ex. polivinilpirrolidona (7–10% (100 g/l) no meio).

5.8 Preparando amostras de ejaculação retrógrada

Em alguns homens, o sêmen passa para a bexiga na ejaculação, resultando em aspermia ou ausência de ejaculação aparente. A confirmação desta situação é obtida examinando uma amostra de urina pós-ejaculatória, procurando pela presença de espermatozoides. Se o tratamento farmacológico não for possível ou não for bem sucedido, os espermatozoides podem ser recuperados da urina. A alcalinização da urina pela ingestão de bicarbonato de sódio, por exemplo, aumentará a chance de que quaisquer espermatozoides que passem para a urina possam manter suas características de motilidade (Mahadevan et al., 1981).

No laboratório, o homem deve ser solicitado a:

- Urinar sem esvaziar completamente a bexiga;
- Produzir um ejaculado por masturbação em um recipiente de amostra;
- Urinar novamente em um segundo recipiente de amostras contendo meio de cultura (para alcalinizar ainda mais a urina).

Tanto o ejaculado, se houver, e as amostras de urina devem ser analisados. Como um grande volume de urina pode ser produzido, muitas vezes é necessário concentrar a amostra por centrifugação (500g por 8 minutos). A amostra retrógrada, uma vez concentrada, e a amostra anterógrada, se produzida, pode ser

processada de forma mais eficaz usando o método de preparação de gradiente de densidade (consulte a Seção 5.5).

5.9 Preparando amostras de ejaculação assistida

Sêmen de homens com ejaculação perturbada, ou aqueles que não podem ejacular, pode ser coletado por estimulação vibratória direta no pênis ou estimulação elétrica retal dos órgãos acessórios. Ejaculados de homens com lesão na medula espinhal frequentemente terão altas concentrações de espermatozoides, diminuição da motilidade dos espermatozoides e contaminação de glóbulos vermelhos e brancos. As amostras obtidas por eletro-ejaculação podem ser processadas de forma mais eficaz por centrifugação em gradiente de densidade (ver Seção 5.5). Independentemente do método de preparação, estes tipos de ejaculados geralmente contêm uma alta porcentagem de espermatozoides imóveis.

CAPÍTULO 6 Criopreservação de espermatozoides

6.1 Introdução

A criopreservação de espermatozoides é uma parte importante do trabalho de muitos laboratórios de análise de sêmen, particularmente aqueles associados a clínicas de infertilidade.

A história da criobiologia do esperma humano data do final da década de 1940. A descoberta de que o glicerol protegia os espermatozoides contra os danos causados pelo congelamento levou ao uso de espermatozoides humanos armazenados em gelo seco a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Polge et al., 1949; Bunge e Sherman, 1953; Bunge et al., 1954). Posteriormente, utilizou-se nitrogênio líquido e a criopreservação de sêmen desenvolveu-se rapidamente em muitos países, com o estabelecimento de bancos comerciais de esperma ou serviços nacionais coordenados (Perloff et al., 1964; David et al., 1980; Clarke et al., 1997; Leibo et al., 2002).

Uma variedade de protocolos de criopreservação é agora utilizada com diferentes crioprotetores e procedimentos de congelamento. A sobrevivência das células após congelamento e descongelamento depende amplamente da minimização da formação de cristais de gelo intracelular. Isto é feito utilizando crioprotetores apropriados e aplicando taxas de esfriamento e aquecimento que minimizam a quantidade de água intracelular sujeita à formação de gelo (Sherman, 1990; Keel & Webster, 1993; Watson, 1995). Se os espermatozoides passam períodos de tempo significativos acima de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a temperatura de transição vítrea), particularmente durante o processo de descongelamento, pode ocorrer recristalização, com crescimento de cristais de gelo intracelular potencialmente prejudiciais.

Os espermatozoides humanos toleram uma gama de taxas de esfriamento e aquecimento. Eles não são muito sensíveis a danos causados pelo rápido esfriamento inicial (choque frio), possivelmente devido à alta fluidez dos ácidos graxos insaturados na bicamada lipídica (Clarke et al., 2003). Eles também podem ser mais resistentes do que outras células ao dano de criopreservação devido ao seu baixo teor de água (cerca de 50%). No entanto, a criopreservação tem um efeito adverso na função do esperma humano, particularmente na motilidade. Em média, apenas cerca de 50% dos espermatozoides móveis sobrevivem ao congelamento e ao descongelamento (Keel & Webster, 1993). A otimização do processo de criopreservação minimizará esse dano e poderá aumentar as taxas de gravidez (Woods et al., 2004).

As taxas de gravidez após inseminação artificial com sêmen doador criopreservado são frequentemente relacionadas à qualidade do esperma após o descongelamento, tempo de inseminação e, particularmente, fatores do receptor como idade, gravidez anterior com inseminação de doador e distúrbios tubulares ovulatórios e uterinos (Le Lannou & Lansac, 1993). Se o sêmen for armazenado sob condições apropriadas, não haverá deterioração óbvia na qualidade do esperma com o tempo; crianças nasceram após fertilização com sêmen armazenado por mais de 28 anos (Feldschuh et al., 2005; Clarke et al., 2006).

Os espermatozoides podem ser armazenados por diversas razões (ver Quadro 6.1). Em alguns casos, o procedimento de criopreservação pode precisar ser modificado (ver Seção 6.2.2).

Quadro 6.1 Razões para a criopreservação de espermatozoides

Sêmen do doador

O sêmen de doadores saudáveis, conhecidos ou supostamente férteis, pode ser armazenado para uso futuro. Esses doadores podem ser recrutados por uma clínica ou banco de esperma e seus espermatozoides usados anonimamente. Alternativamente, os destinatários podem conhecer os doadores. Os espermatozoides doadores podem ser usados para AI, IUI, IVF ou ICSI:

- Para a parceira de um homem infértil sem espermatozoides vivos ou espermátides alongadas adequadas para ICSI, ou onde o tratamento falhou ou é muito caro;
- Para prevenir a transmissão de um distúrbio hereditário;
- Para prevenir anemia hemolítica fetal por incompatibilidade de grupo sanguíneo;
- Após abortos recorrentes, em que a inseminação do doador pode resultar em uma gravidez bem-sucedida;
- Para mulheres que desejam conceber, mas não têm um parceiro masculino.

A legislação local e nacional relativa ao rastreio genético e de infecções deve ser sempre cumprida.

Preservação de fertilidade

O sêmen pode ser obtido e armazenado antes que um homem seja submetido a um procedimento ou exposição que possa impedir ou prejudicar sua fertilidade, como:

- Vasectomia (no caso de uma futura mudança na situação conjugal ou desejo de mais filhos);
- Tratamento com agentes citotóxicos ou radioterapia, o que pode comprometer permanentemente a espermatogênese (Meseguer et al., 2006; Schmidt et al., 2004);
- Dever ativo em uma ocupação perigosa, por ex. nas forças militares, em países onde a procriação póstuma é aceitável.

Tratamento de infertilidade

Os espermatozoides podem ser armazenados para tratamento da parceira do homem por inseminação artificial pelo sêmen do marido (AIH), IUI, IVF ou ICSI, em casos de:

- Oligozoospermia grave ou presença intermitente de espermatozoides móveis no sêmen (como backup para ICSI) (Bourne et al., 1995);
- Tratamento de infertilidade que poderia não persistir, como cirurgia para obstrução do trato genital ou tratamento com gonadotrofina para hipogonadismo hipotalâmico-hipofisário;
- Necessidade de coleta especial, como ejaculação assistida para pacientes com lesão medular, espermatozoides de ejaculação retrógrada na urina ou coleta cirúrgica do trato genital;
- Homens incapazes de fornecer sêmen fresco no dia do procedimento ART.

Minimizando a transmissão de doenças infecciosas

Para homens com HIV controlado com terapia antirretroviral, amostras com uma carga viral indetectável podem ser armazenadas para IUI, IVF ou ICSI, para tentar a concepção, reduzindo o risco de transmissão do HIV para a parceira.

Nota 1: Para a preservação da fertilidade ou tratamento de infertilidade, amostras normais suficientes devem ser armazenadas para 10 ou mais inseminações, para garantir uma boa chance de gravidez. Com sêmen anormal, o agrupamento de múltiplas amostras para AIH não foi provado ser útil.

Nota 2: Como apenas um único espermatozoide é necessário para a ICSI de cada oócito, vale a pena a criopreservação de qualquer espermatozoide vivo.

Nota 3: O armazenamento de sêmen coletado antes de um procedimento potencialmente esterilizante muitas vezes tem um valor psicológico significativo, porque dá a esperança de uma futura paternidade. Para homens que se submetem a terapia com agentes alquilantes ou radioterapia, o sêmen deve ser coletado antes do início da terapia, devido ao risco de mutagênese nos espermatozoides. Todos os homens que necessitem quimio ou radioterapia, incluindo adolescentes (Kamischke et al., 2004), devem ter a possibilidade de armazenamento de espermatozoides.

A criopreservação e o subsequente armazenamento de espermatozoides humanos é um processo altamente complexo que coloca uma responsabilidade especial e uma responsabilidade potencial na equipe do laboratório. Recomenda-se uma avaliação de risco abrangente (ver Quadro 6.2).

Quadro 6.2 Avaliação de risco da criopreservação e o armazenamento de sêmen humano

Ao avaliar os riscos associados à criopreservação e armazenamento de sêmen, as seguintes questões devem ser consideradas.

Recursos

- Segurança física dos recipientes, espécimes e sala de armazenamento, para reduzir o risco de perda por roubo ou incêndio, ou falha das palhetas, ampolas e recipientes de criopreservação, ou suprimento de nitrogênio líquido.
- Adequação do equipamento para o uso proposto.
- Sistema de contenção e remoção de nitrogênio.

Segurança e proteção do pessoal

- Equipamentos de proteção pessoal.
- Sistemas de alarme para detecção de baixo nível de nitrogênio líquido e baixos níveis de oxigênio atmosférico.

Risco de contaminação cruzada

Para reduzir o risco de contaminação cruzada com agentes infecciosos entre amostras armazenadas (por exemplo, transmissão de HIV ou hepatite B, ou C, via frasco de criopreservação), considerar:

- Tipo de recipiente de armazenamento: frascos ou palhetas e o método de selagem de palhetas (calor ou polímero);
- Natureza do armazenamento: nitrogênio líquido ou em fase de vapor;
- Protocolo e método de armazenamento de amostras de alto risco (amostras conhecidas ou suspeitas de conter vírus).

Segurança de amostras congeladas

- Dividir amostras e armazenar em locais diferentes para reduzir o risco de perda total.
- Verificar duas vezes a identidade das amostras em cada etapa.
- Usar rótulos robustos e códigos de identificação.
- Ter procedimentos para auditoria regular do uso do material e das amostras restantes em armazenamento.

Fontes: Tedder, 1995; Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; Tomlinson, 2005.

Nota 1: O armazenamento na fase de vapor e não no próprio nitrogênio líquido reduz as chances de contaminação cruzada. No entanto, grandes gradientes de temperatura existem em frascos de armazenamento de vapor, dependendo da forma, carga da amostra e tipo de containers de amostra. Em casos extremos, uma temperatura inferior a -100 °C não pode ser alcançada (Tomlinson, 2005). Se for utilizado o armazenamento em fase de vapor, é necessário ter cuidado para garantir que a temperatura das amostras não ultrapasse os -130 °C (a temperatura de transformação vítrea), pois isso pode resultar em danos aos espermatozoides (ver Clarke, 1999).

Nota 2: Palhetas seguras feitas de resina ionomérica selável a quente estão disponíveis para armazenamento em nitrogênio líquido. Estes são à prova de vazamento, à prova de bactérias e vírus, e mecanicamente resistentes a -196 °C (Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; Tomlinson, 2005).

6.2 Protocolos de criopreservação de sêmen

Vários protocolos de congelamento e gerenciamento de banco de esperma estão disponíveis (Mortimer, 2004, Wolf, 1995). Vários crioprotetores estão disponíveis comercialmente. Detalhes de um crioprotetor comumente usado, glicerol-ovo-gema-citrato (GEYC), e controlado por máquina ou congelamento de vapor são dados abaixo.

6.2.1 Procedimento padrão

6.2.1.1 Preparando o crioprotetor GEYC

1. Adicionar 1,5 g de glicose e 1,3 g de dihidrato tribásico de citrato de sódio a 65 ml de água purificada estéril.
2. Adicionar 15 ml de glicerol e misturar bem.
3. Adicionar 1,3 g de glicina. Quando dissolvido, filtrar a solução através de um filtro de poros de 0,45 μm .
4. Adicionar 20 ml de gema de ovo fresca (geralmente obtida de ovos livres de patógenos específicos): lavar o ovo e retirar a casca. Perfurar a membrana ao redor da gema e pegar com uma seringa (aproximadamente 10 ml de gema serão obtidos por ovo).
5. Colocar a suspensão inteira em banho-maria a 56 °C por 40 minutos com agitação ocasional.
6. Verificar o pH da solução. Se estiver fora do intervalo 6,8-7,2, descartar a solução e preparar uma nova, caso os ingredientes ou quantidades incorretas tenham sido adicionadas.
7. A cultura bacteriana para testes de esterilidade pode ser realizada nesta fase.
8. Testes de toxicidade espermática podem ser realizados nesta fase.
9. Dispensar a solução em alíquotas de 2 ml em um gabinete de trabalho estéril e armazenar a -70 °C.
10. Usar dentro de um prazo de 3 meses.

Crioprotetores semelhantes ao GEYC estão comercialmente disponíveis.

6.2.1.2 Adicionando crioprotetor ao sêmen

1. Descongelar o crioprotetor, aquecer até a temperatura ambiente e misturar. Aquecimento inicial a 37 °C pode ser benéfico.
2. Altas concentrações de glicerol são prejudiciais para os espermatozoides. Portanto, é vital ter um cuidado especial ao adicionar e misturar o crioprotetor com o sêmen.

3. Adicionar um volume de GEYC a dois volumes de sêmen, gota a gota com agitação, ou por pipetagem suave para cima e para baixo, ou gradualmente em cinco adições, misturando suavemente, durante aproximadamente 10 minutos à temperatura ambiente.
4. Após a adição do GEYC, incubar a mistura a 30-35 °C por 5 minutos.

6.2.1.3 Preenchimento das palhetas para sêmen

1. Palhetas plásticas de 0,5 ml são populares devido às suas propriedades de transferência de calor e facilidade de armazenamento. Frascos plásticos podem ser usados para armazenar volumes maiores.
2. Aspirar a mistura de sêmen e GEYC em palhetas plásticas para sêmen de 0,5 ml ou colocar em frascos criogênicos. As palhetas podem ser preenchidas com uma linha de Schlenk em um dispositivo de vácuo ou um adaptador que se encaixe na ponta da palheta.

6.2.1.4 Selagem das palhetas de sêmen

As palhetas com um tampão superior de pó de álcool polivinílico seco, preso entre duas seções de algodão, fecham automaticamente quando o sêmen entra em contato com o pó e o polimeriza.

1. Deixar um espaço aéreo de 1 cm na extremidade inferior batendo suavemente a palheta na lateral do container.
2. Fechar esta extremidade mergulhando-a em pó de selagem de álcool polivinílico estéril e colocando as palhetas em água a uma profundidade de 1 cm.
3. A selagem a quente das palhetas pode ser preferível, pois os selos em pó podem ser permeáveis a agentes infecciosos.
4. Alternativamente, as amostras podem ser armazenadas em frascos de plástico ou ampolas. Devem ser preenchidos até não mais de 90% da sua capacidade.
5. Limpar o exterior do recipiente a seco e depois esterilizar com 70% (v/v) de álcool ou outro produto descontaminante microbiano.

6.2.1.5 Esfriamento e congelamento do sêmen em freezers programáveis

Existem freezers programáveis que controlam a injeção de vapor de nitrogênio líquido na câmara de congelamento.

1. Colocar as palhetas ou criotubos em um freezer programável e seguir as instruções do fabricante para ativar o programa.

2. Um programa comum é resfriar as palhetas a 1,5 °C por minuto de 20 °C a -6 °C e depois a 6 °C por minuto até -100 °C. Isso leva cerca de 40 minutos. A máquina então manterá a câmara a -100 °C por 30 minutos para permitir atrasos antes que as palhetas sejam transferidas para o nitrogênio líquido.

3. Outros procedimentos, mais complicados, podem ser usados, dependendo da experiência dos laboratórios individuais. (Pérez-Sánchez et al., 1994).

6.2.1.6 Esfriando e congelando o sêmen manualmente

Os métodos manuais são menos controláveis que os programáveis, mas podem fornecer resultados adequados. Existem muitas alternativas para este procedimento.

1. Colocar as palhetas em um freezer (-20 °C) por 30 minutos, depois em gelo seco (-79 °C) por 30 minutos antes de colocar em nitrogênio líquido (-196 °C).
2. As palhetas podem ser tiradas do congelador de -20 °C e levadas para outro congelador a -70 °C, ou para um cesto ou um cálice numa mistura de vapor de nitrogênio líquido e ar no gargalo de um pequeno container de nitrogênio líquido de -80 °C a -100 °C por 10-15 minutos, antes de serem colocadas em nitrogênio líquido. Também podem ser colocadas em um suporte, 10-20 cm acima do nitrogênio líquido em um container grande e deixadas por 1 hora para desenvolver um gradiente de temperatura acima do nitrogênio líquido.

6.2.1.7 Armazenamento do sêmen congelado

1. Colocar as palhetas congeladas em tubos de armazenamento de plástico (mini-cálices) e inseri-los em cálices de armazenamento maiores.
2. Colocar frascos criogênicos em cliques dentro de tubos metálicos ou em caixas de armazenamento que se encaixem nos tanques de armazenamento, preferencialmente em fase de vapor, porque as tampas criogênicas não fornecem uma vedação completa.
3. Guardar os cálices com as palhetas ou varinhas em frascos ou tanques de vácuo de nitrogênio líquido (Dewar).

6.2.1.8 Transporte de sêmen congelado

Os espermatozoides congelados podem ser transportados em tanques secos de transporte, refrigerados com nitrogênio líquido, que estão disponíveis comercialmente. Dependendo do tamanho do meio de transporte, as temperaturas adequadamente baixas podem ser mantidas de vários dias a várias semanas, enquanto o nitrogênio líquido evapora.

Nota: Garanta que as regulamentações locais, nacionais e internacionais sobre o transporte de nitrogênio líquido e amostras biológicas humanas sejam cumpridas.

6.2.1.9 Descongelamento do sêmen congelado

1. Antes de usar, remover o máximo de palhetas necessárias do tanque de nitrogênio líquido ou vapor e colocá-las em papel absorvente ou em um suporte para permitir que atinjam a temperatura ambiente (isso leva cerca de 6 minutos). Cryovials demoram mais para descongelar (10–20 minutos).
2. Em 10 minutos, cortar a ponta da palheta com uma tesoura estéril e carregar o dispositivo de inseminação (para uso terapêutico) ou expulsar o conteúdo para determinar a motilidade pós-descongelamento (para verificar o processo de congelamento).
3. Descongelamento mais rápido pode ser melhor se o processo de congelamento for rápido (Verheyen et al., 1993).
4. A remoção do crioprotetor por diluição sequencial em etapas de pequeno volume evita estresses osmóticos indevidos (Gao et al., 1995) e pode melhorar os resultados de gravidez.

6.2.2 Protocolos de congelamento modificados para amostras oligozoospermáticas e espermatozoides recuperados cirurgicamente

- O sêmen que contém apenas alguns espermatozoides móveis e as suspensões espermáticas obtidas do trato genital pode ser armazenado para posterior ICSI.
- Se necessário, centrifugar o sêmen a 1500g durante 10 minutos para concentrar os espermatozoides em um volume mínimo de cerca de 0,4 ml. Adicionar GEYC e processar conforme descrito acima.
- Fluido epididimal, extratos testiculares ou outras suspensões de espermatozoides processadas no laboratório por meio de “swim-up” ou centrifugação em gradientes de densidade (ver Seções 5.4 e 5.5) e ressuspensos em meio de preparação de espermatozoides com tampão Hepes e albumina de soro humano 4 mg/ml podem ser criopreservados com glicerol glicose de Tyrode (TGG) ou um crioprotetor comercial contendo albumina humana.

6.2.2.1 Crioprotetor modificado (TGG)

1. Para 40 ml de solução de Tyrode estéril (ver Apêndice 4, seção A4.9) adicionar 5 ml de reserva de albumina humana estéril (100 mg/ml), 0,9 g de glucose e 5 ml de glicerol. Filtrar a solução através de um filtro de poros de 0,45 µm.
2. Armazenar alíquotas de 2 ml a –70 °C.

6.2.2.2 Procedimento

1. Se o volume da amostra for maior que 2,0 ml, e se houver poucos espermatozoides móveis, centrifugar a 1500g por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Aspirar o sobrenadante para deixar cerca de 1,0 ml e ressuspender os espermatozoides nele. Determinar a percentagem de espermatozoides

móveis (PR + NP); se há muito poucos espermatozoides móveis, estimar o número de células móveis sob cada lamínula.

3. Descongelar uma alíquota de 2 ml de TGG.
4. Adicionar um volume de TGG a um volume de preparação de esperma final, gradualmente, misturando.
5. Embalar em palhetas ou criotubos e congelar como acima. Se as palhetas não estiverem cheias, tampar o mini-cálice para evitar que as palhetas flutuem quando congeladas.

6.2.3 Rotulagem de lâminas e frascos

Um sistema de codificação robusto para rotular lâminas ou frascos é essencial. Use o código em todas as folhas de dados de laboratório e bancos de dados de computador para manter o anonimato dos doadores. Mantenha a chave do código com a identidade do doador separada e segura. Existem muitos sistemas de codificação potenciais. O requisito importante é ter um código exclusivo para cada doador ou cliente no armazenamento. O seguinte sistema de codificação funciona satisfatoriamente.

- Cada novo doador anônimo recebe um código de duas letras (AA, AB, AC ... BA ... etc., terminando com ZZ, após o qual é necessário um novo método).
- Um sistema de código de três letras é usado para pacientes e doadores conhecidos: AAA, AAB, etc.
- Cada espécime de um doador em particular é indicado por um número seguindo seu código pessoal. Por exemplo, a oitava doação dada pelo doador BT é denominada BT-8.
- O código da letra e o número da amostra devem ser escritos em cada palheta ou frasco, usando um marcador preto indelével. Como alternativa, use uma etiqueta impressa projetada para uso em nitrogênio líquido.
- O mini-cálice no qual as palhetas são armazenadas também deve conter um adesivo com o código e o número da amostra.
- O código de cores nos cálices, mini-cálices, palhetas e pó de vedação também é útil para identificação rápida.
- Enquanto os espermatozoides armazenados são utilizados, o registro das palhetas ou frascos será ajustado no banco de dados.

Nota: Todos os procedimentos envolvendo a identidade de amostras de doadores ou pacientes, incluindo o recebimento de amostras, preparação e rotulagem de palhetas, colocação em tanques e descongelamento de palhetas para uso ou descarte, devem ser checados duas vezes por duas pessoas e a evidência desta checagem deve ser anotada nos registros laboratoriais. Idealmente, um técnico deve processar apenas uma amostra de sêmen por momento.

PARTE III.

Garantia da qualidade

CAPÍTULO 7 Garantia de qualidade e controle de qualidade

7.1 Controle de qualidade no laboratório de andrologia

Os laboratórios de Andrologia precisam produzir resultados confiáveis para garantir decisões apropriadas de diagnóstico e assistência médica. Como a análise de sêmen é altamente complexa e processualmente difícil de padronizar, o controle de qualidade (QC) é essencial para detectar e corrigir erros sistemáticos e alta variabilidade de resultados. As grandes discrepâncias entre as avaliações da concentração de espermatozoides e a morfologia em diferentes laboratórios (Neuwinger et al., 1990; Matson, 1995; Cooper et al., 1999, 2002) enfatizam a necessidade de melhoria do QC e da padronização.

Seja qual for seu tamanho, cada laboratório deve implementar um programa de garantia de qualidade (QA), baseado em métodos e procedimentos padronizados, para garantir que os resultados sejam exatos e precisos (De Jonge, 2000; Mortimer & Mortimer, 2005). Em alguns países, os programas de QA são exigidos por lei, em outros, por organismos de acreditação ou sistemas de seguro de saúde. Em determinadas configurações, os recursos disponíveis podem não permitir a implementação completa dos procedimentos descritos aqui. No entanto, os parâmetros fundamentais de concentração espermática, morfologia e motilidade devem sempre ser monitorados por um controle de qualidade interno e, quando possível, por um controle de qualidade externo.

Existem vários livros descrevendo o controle de qualidade (por exemplo, Wheeler & Chambers, 1992; Wheeler, 1993) e alguns especialistas em controle de qualidade laboratorial que fornecem uma descrição mais detalhada do processo de QC (por exemplo, Cembrowski & Carey, 1989; Carey & Lloyd, 1995; Westgard, 2002). As atividades de QC realizadas em um laboratório são chamadas de controle de qualidade interno (IQC) (consulte a Seção 7.6). O controle de qualidade externo (EQC) é a avaliação dos resultados de vários laboratórios para as mesmas amostras (ver Seção 7.11).

7.2 A natureza dos erros na análise do sêmen

O gerenciamento dos procedimentos de QC requer um entendimento da origem e magnitude dos erros de medição. Qualquer medida tem um grau de erro, cuja magnitude é descrita por um intervalo de confiança com um limite superior e um limite inferior. Uma medida precisa é aquela em que os limites estão próximos; um resultado é exato quando está próximo do valor verdadeiro. Existem duas classes de erros: aleatórios e sistemáticos. Erros aleatórios, que afetam a precisão, surgem de diferenças aleatórias em leituras ou amostragem e podem ser avaliados a partir de medições repetidas pelo mesmo observador e equipamento. Os erros sistemáticos (às vezes chamados de viés) são mais insidiosos, pois surgem de fatores que alteram o resultado em apenas uma direção e, portanto, não podem ser detectados a partir de medições repetidas.

Mesmo quando a amostra está bem misturada, a distribuição aleatória de espermatozoides no sêmen, ou em fixador ou meio, é responsável pela grande parte da falta de precisão nos resultados da análise de sêmen. A avaliação da concentração, motilidade, vitalidade e morfologia espermática envolve a contagem de um número limitado de espermatozoides, que se presume serem representativos de toda a amostra. A variação amostral criada pela seleção de um volume fixo (para estimar a concentração) ou um número fixo de espermatozoides (para classificar a motilidade, a morfologia ou a vitalidade) é um erro aleatório comumente referido como erro estatístico ou de amostragem. Alguma terminologia nesta área é dada no Quadro 7.1. Outros erros podem ser introduzidos quando a amostra é misturada ou as alíquotas são removidas; estes podem ser minimizados melhorando a técnica (veja Seção 7.13).

O objetivo do controle de qualidade na análise de rotina de sêmen é monitorar a extensão de erros aleatórios e sistemáticos e reduzi-los quando possível. Todos esses erros precisam ser minimizados para que os resultados sejam críveis e úteis para clínicos e pesquisadores.

7.3 Minimizando o erro de amostragem estatístico

Embora o erro de amostragem possa ser reduzido pela avaliação de um maior número de espermatozoides (ver Tabela 2.2 e Quadros 2.5 e 2.7), deve-se estabelecer um equilíbrio entre o ganho em precisão estatística, o tempo real necessário para obtê-lo e a possível perda de exatidão no trabalho do técnico devido à fadiga. O uso de intervalos de confiança de 95% para avaliar a aceitabilidade das repetições significa que, para cerca de 5% das amostras, diferenças maiores que $1,96 \times$ erro padrão ocorrerão como resultado apenas da variação do acaso e a medida terá sido repetida desnecessariamente. Este trabalho adicional pode ser aceitável; alternativamente, limites mais amplos ($2,6 \times$ ou $3 \times$ erro padrão) poderiam ser escolhidos para reduzir a frequência desse evento (para aproximadamente 1% e 0,2%, respectivamente).

Quadro 7.1 Terminologia em garantia de qualidade e controle de qualidade

Exatidão	Proximidade do resultado de um teste com o valor real.
Valor atribuído	Estimativa do valor real, muitas vezes derivada da média dos resultados de vários laboratórios (valor alvo, valor de consenso, valor verdadeiro convencional).
Viés	O desvio do resultado de um teste do valor atribuído. Imprecisões reproduzíveis que vão, consistentemente, na mesma direção (erro sistemático).
Distribuição binomial	Uma distribuição teórica usada para modelar eventos que entram em duas categorias, por exemplo móvel/imóvel, viável/não viável.
Gráfico de Bland-Altman	Um gráfico da diferença entre uma série de observações pareadas contra seu valor médio.
Variação de causa comum	Uma fonte de variação natural que afeta todos os valores individuais do processo em estudo.
Intervalo de confiança de 95%	Um intervalo calculado a partir de dados observados que inclui o valor real em 95% das repetições ($\text{média} \pm 1,96 \times \text{SE}$ ou $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ para contagens).
Valor de consenso	ver valor atribuído.
Valor verdadeiro convencional	ver valor atribuído.
Gráfico de controle	Um gráfico de sequência de tempo mostrando uma série de medições individuais, junto com uma linha central e limites de controle.
Limites de controle	A variação máxima permitida de um processo devido apenas a causas comuns. Uma variação além do limite de controle é evidência de que causas especiais podem estar afetando o processo.
Deslocamento (drift)	Pequenas mudanças sucessivas em valores, levando a uma mudança na precisão com o tempo.
Controle de qualidade externo	Testes de qualidade realizados por um órgão externo que faz comparações entre diferentes laboratórios para diversos procedimentos. Útil para detectar variações sistemáticas e avaliar a precisão.
Boas práticas de laboratório (BPL)	Um conjunto de princípios que fornece uma estrutura dentro da qual os estudos de laboratório são planejados, executados, monitorados, registrados, informados e arquivados.
Sob controle	Um processo está sob controle quando todos os valores estão dentro dos limites de controle esperados.
Controle de qualidade interno	Testes de qualidade que medem a variabilidade de um procedimento existente em um laboratório. Esses testes avaliam a precisão das operações do dia a dia. Útil para detectar variação aleatória (avaliação da precisão).
ISO	Organização Internacional para Padronização. Um organismo que define padrões internacionais, inclusive para qualidade de laboratório.
Amostras QC manufaturadas	Amostras comercialmente disponíveis, fabricadas e analisadas (estudadas) de acordo com as diretrizes de fabricação.
Fora de controle	Um processo está fora de controle quando um valor medido excede os limites de controle esperados, ou está dentro dos limites de controle, mas mostra uma tendência significativa nos valores. Um processo que está fora de controle deve ser avaliado.
PDCA	Planejar, fazer, verificar, agir (ciclo de Shewhart).
Distribuição de Poisson	Uma distribuição teórica usada para modelar contagens.
Precisão	Proximidade de concordância entre medições replicadas. Comumente expressa como imprecisão (deslocamento; a mesma-, entre-, intra-/determinação, lote, ensaio ou variação de laboratório). Medições de precisão não são afetadas por viés (veja também erro de amostragem).
Erro de precisão	ver erro de amostragem.
Erro aleatório	ver erro de amostragem.

Gráfico S	Um gráfico de controle de desvios padrão dos valores medidos em relação ao tempo. É usado para monitorar a uniformidade do processo e precisão de medição.
Erro de amostragem	Erro envolvido na contagem de um número limitado de espermatozoides; é inversamente proporcional à raiz quadrada do número contado. O erro de amostragem (%SE) é o erro padrão de uma contagem (\sqrt{N}) expressa como uma porcentagem da contagem ($100 \times (\sqrt{N}/N)$). (erro aleatório, erro de precisão, erro de amostragem estatística).
Ciclo de Shewhart	ver PDCA.
Variação de causa especial	Uma fonte de variação que é grande, intermitente ou imprevisível, afetando apenas alguns dos valores individuais do processo em estudo (variação aleatória).
Procedimentos operacionais padrão	Conjunto de instruções sobre como os processos e métodos devem ser executados.
Erro estatístico de amostragem	ver erro de amostragem.
Erro sistemático	ver viés.
Valor alvo	ver valor atribuído.
Variação	A diferença entre os resultados individuais de um processo. A causa da variação (erro) pode ser comum ou especial.
Gráfico \bar{X}	Um gráfico de controle mostrando os valores medidos em relação ao tempo. Ele é usado para monitorar a variabilidade do processo e detectar alterações dos valores de destino (avaliação da exatidão).
Gráfico de Youden	Um gráfico de valores de uma amostra traçada em relação a outra.

7.4 O programa de garantia de qualidade

A melhor maneira de alcançar resultados aceitáveis é desenvolver e implementar um programa contínuo de garantia de qualidade. Um programa de QA monitora e avalia, regularmente, a qualidade e adequação dos dados e serviços que o laboratório fornece. Gestão, administração, análise estatística e ação preventiva e corretiva formam o núcleo do plano de QA. O monitoramento contínuo não apenas detecta e corrige problemas, mas também ajuda a preveni-los.

O programa de QA deve ser descrito em um manual de qualidade (QM) contendo procedimentos operacionais padrão (SOPs) e um conjunto detalhado de instruções para os diferentes processos e métodos utilizados no laboratório. Ligadas a essas instruções estão vários formulários e documentos, como notas de encaminhamento, planilhas para formulários de informes de laboratório e folhetos informativos para clientes e médicos de referência. O QM descreve a estrutura organizacional do laboratório, listando as habilidades necessárias (treinamento) em diferentes posições (descrições de trabalho), bem como cronogramas para reuniões entre o pessoal e supervisores, e planos de educação continuada, desenvolvimento e treinamento de pessoal.

7.5 Manual de procedimentos laboratoriais

Os Procedimentos Operacionais Padrão escritos devem ser rigorosamente seguidos por todos os técnicos de laboratório. Eles também são úteis para treinamento e são uma referência importante para procedimentos não rotineiros e para processos de solução de problemas que não estão produzindo resultados aceitáveis.

Esses protocolos incluem notas de encaminhamento, procedimentos de informações ao paciente, agendamentos de consultas, realização de testes, relatórios de resultados, treinamento de novos membros do laboratório, testes e monitoramento de equipamentos, uso de gráficos de controle e procedimentos a serem seguidos quando os valores desses gráficos indicarem um problema (ensaios fora de controle). Os SOPs devem abranger os procedimentos para verificar se todos os equipamentos estão em condições adequadas de operação, incluindo verificação de rotina, cronograma e registro de calibração e documentação sobre a manutenção de equipamentos científicos, como microscópios, centrífugas, pipetas, balanças, freezers, refrigeradores e equipamento de emergência (por exemplo, lava-olhos e chuveiros). O método básico é manter um diário para cada equipamento, no qual todos os ajustes e calibrações sejam registrados. Esses registros são úteis se um procedimento de laboratório começar a produzir resultados fora de controle.

7.6 Controle de qualidade interno

O controle de qualidade interno (IQC) monitora a precisão e indica, através de resultados fora dos limites de controle, quando o ensaio pode estar com erro. O procedimento de QC utilizado depende da avaliação a ser controlada, uma vez que diferentes avaliações são sensíveis a diferentes tipos de erros. As avaliações que envolvem diluição, pipetagem e reutilização de câmaras exigem testes regulares, enquanto a avaliação de uma lâmina fixa, ou fita de vídeo, pode ser testada com menos frequência, pois há menos etapas em que erros podem ocorrer.

Uma maneira prática de implementar o IQC é incluir materiais IQC na carga de trabalho regular do laboratório e monitorar os resultados desses materiais usando gráficos de controle de qualidade. Desta forma, o IQC torna-se parte da rotina do laboratório e é conduzido de acordo com os padrões locais ou regionais. É importante que as amostras de QC sejam analisadas como parte do trabalho de laboratório de rotina e não tratadas de uma maneira especial, o que poderia fornecer um resultado mais preciso e exato do que para amostras de rotina. Os tipos de material IQC usados para monitorar a variação dentro e entre os técnicos podem ser comprados ou feitos no laboratório. Existem vantagens e desvantagens em cada abordagem.

7.6.1 Amostras comerciais de Controle de Qualidade Interno

As amostras IQC disponíveis comercialmente são fornecidas com uma extensão média e conhecida de variação estabelecida para aquele produto. A vantagem disso é que tanto exatidão quanto precisão podem ser avaliadas. A variação nos resultados da análise do sêmen no laboratório pode ser comparada com a variação associada às amostras da fonte. Com essas amostras, o laboratório deve estabelecer sua própria tabela de controle para avaliar a precisão e deve usar o intervalo recomendado pelo fabricante para avaliar a exatidão (Westgard, 2002). As desvantagens das amostras IQC adquiridas são seu custo e o fato de não estarem disponíveis universalmente. Deve ser feita uma observação sobre como os valores-alvo fornecidos pelo fabricante foram obtidos (avaliações múltiplas, análise espermática assistida por computador, valores de consenso, médias pareadas, etc.).

7.6.2 Amostras de Controle de Qualidade Interno produzidas no laboratório

As vantagens das amostras IQC produzidas no laboratório são os custos reduzidos e o fato de que as amostras podem ser geradas especificamente para as necessidades específicas do laboratório. Muitas amostras, cobrindo uma ampla gama de resultados, podem ser preparadas e armazenadas por longos períodos. Sua desvantagem é que os valores-alvo serão desconhecidos. Recomenda-se, e por vezes é necessário, que existam amostras de controle para avaliar um intervalo médio de valores (por exemplo, concentração de espermatozoides 50×10^6 por ml), bem como um intervalo crítico de valores (por exemplo, concentrações de espermatozoides $<15 \times 10^6$ por ml).

7.6.3 Amostras de Controle Interno armazenadas (comerciais ou produzidas no laboratório)

Amostras de sêmen armazenadas podem ser usadas em programas IQC para avaliar a concentração espermática, a motilidade espermática, a morfologia espermática e a vitalidade espermática. Estes têm a vantagem de que o valor alvo é conhecido (para amostras compradas), ou fornecido (por programas EQC) ou estimado a partir de avaliações múltiplas (para material produzido em laboratório), de modo que erros sistemáticos podem ser detectados a partir de medições repetidas.

7.6.3.1 Concentração do espermazoide

Amostras de sêmen de diferentes concentrações de espermatozoides podem ser diluídas e armazenadas. Vários espécimes podem ser reunidos para atingir certa concentração ou um volume maior de suspensão diluída, mas pode ocorrer aglutinação de espermatozoides.

Consulte o Apêndice 7, seção A7.6, para obter instruções sobre como preparar e armazenar suspensões de espermazoide não aglutinadas para IQC a partir da medição de concentrações de espermatozoides.

7.6.3.2 Morfologia e Vitalidade do Espermatozoide

Para a morfologia, lâminas de esfregaço de sêmen fixo seco ao ar (ver Seção 2.13.2.1) ou esfregaços de sêmen fixos e corados (ver Seção 2.14) e para vitalidade, esfregaços com eosina-nigrosina (ver Seção 2.6.1) podem ser usados. Os esfregaços devem ser escolhidos das amostras de rotina do laboratório, marcados com códigos de identificação. As amostras devem ser preparadas a partir de sêmen de boa, média e baixa qualidade. As lâminas podem ser reutilizadas; uma vez que elas comecem a se deteriorar, novos esfregaços devem ser preparados. É melhor usar uma variedade de lâminas para eliminar a possibilidade de os técnicos se familiarizarem com determinadas lâminas, o que pode resultar em análises tendenciosas.

Veja Apêndice 7, seção A7.7, sobre como preparar lâminas de QC para avaliação de morfologia. Se as lâminas forem preparadas e armazenadas adequadamente, elas permanecerão estáveis por muitos meses ou mesmo anos. Conjuntos de lâminas diferentes podem ser alternados ou sobrepostos uns aos outros durante a transição de um conjunto de QC para outro.

7.6.3.3 Motilidade do espermatozoide

Espécimes gravados em fita de vídeo, CD ou DVD, na clínica, de distribuições EQC, ou feitos especificamente, podem ser usados para o controle de qualidade. As gravações em vídeo devem ser de uma ampliação similar àquela observada no microscópio quando amostras reais são analisadas. O uso de uma câmera de televisão e de uma tela para todas as avaliações de rotina diárias, com a mesma ampliação e contraste das gravações de vídeo, aumenta a validade das gravações de vídeo para QC.

Ver Apêndice 7, Seção A7.5, sobre como fazer gravações de vídeo de QC para medições de mobilidade.

7.6.4 Amostras de Controle de Qualidade Interno frescas (produzidas em laboratório)

Um método simples de IQC é aquele em que um ou mais técnicos fazem medições replicadas em alíquotas separadas de uma amostra de sêmen. As avaliações replicadas devem ser realizadas da mesma forma que as análises de rotina de sêmen. Esta forma de QC pode ser aplicada a avaliações de concentração de espermatozoides, motilidade espermática, morfologia espermática e vitalidade espermática. A natureza subjetiva das avaliações de aglutinação e agregação, e a variabilidade do teste de reação de antiglobulina mista (Bohring & Krause, 1999), juntamente com a necessidade de gametas vivos e controles positivos, tornam difícil o controle de qualidade para esses ensaios.

O IQC de medição da motilidade espermática em amostras frescas apresenta problemas especiais, uma vez que a motilidade pode diminuir com o tempo e, portanto, precisa ser avaliada primeiro - e aproximadamente ao mesmo tempo - por todos os técnicos. As preparações de lâmina e lamínula para mobilidade são estáveis por apenas alguns minutos, portanto, câmaras de profundidade fixa, que são estáveis por 30 minutos, também podem ser usadas. O uso de um microscópio de ponte, ou um microscópio com uma câmera de vídeo ligada a uma tela, permite que vários técnicos avaliem o mesmo campo da mesma preparação ao mesmo tempo. Uma grade de acetato pode ser colocada sobre o monitor para

imitar a grade ocular usada durante a análise de motilidade ao vivo (ver Apêndice 7, Seção A7.5).

Os laboratórios que usam sistemas CASA devem seguir os procedimentos dos fabricantes para realizar o controle de qualidade. Isto muitas vezes envolve a reprodução de imagens armazenadas de espermatozoides em movimento que são marcados como nadando a determinadas velocidades.

7.7 Procedimentos estatísticos para analisar e informar erros sistemáticos entre técnicos

A criação e interpretação de gráficos de controle é parte integral da garantia de qualidade no laboratório. Quais sistemas de QC são utilizados, depende da natureza do problema e do material disponível.

7.7.1 O gráfico \bar{X}

O gráfico \bar{X} está projetado principalmente para detectar resultados que são muito diferentes do valor alvo ou um aumento geral na variação. Erros sistemáticos podem ser detectados pela medição sequencial das mesmas amostras. Medições repetidas são feitas em uma amostra e os valores médios são traçados contra o tempo. Amostras armazenadas precisam ser usadas, pois o procedimento depende do conhecimento do valor verdadeiro ou objetivo, que pode ser fornecido pelo fabricante (amostras compradas), ou um programa EQC, ou estimado (a partir de várias avaliações do material).

Comentário: O gráfico \bar{X} é menos sensível que o gráfico S ao detectar se os técnicos estão produzindo resultados altamente variáveis (ver Seção 7.7.2). Para verificar a variabilidade, o intervalo de valores para cada amostra QC pode ser monitorado em um gráfico S de maneira semelhante ao gráfico \bar{X} , com limites de aviso e ação definidos.

7.7.1.1 Calculando os limites de controle do gráfico \bar{X}

Uma série de amostras de QC da mesma preparação IQC é medida sequencialmente. Após as primeiras 10 amostras terem sido analisadas, os limites de controle são calculados para cada técnico. Estes representam o intervalo para medições repetidas em uma amostra, para um procedimento específico executado pelos mesmos analistas. As estimativas da média e do desvio padrão são recalculadas a cada 10 amostras e os limites de controle são atualizados usando os novos valores para \bar{X} e S , desde que não haja problemas com o QC. Antes que as amostras de QC acabem, um novo lote deve ser preparado e as 10 primeiras amostras do novo lote analisadas em conjunto com as amostras restantes do lote antigo para estabelecer os novos limites de controle. Os fatores usados para calcular os limites de controle são fornecidos na Tabela 7.1 e exemplos trabalhados são mostrados nos Quadros 7.2 e 7.3.

Tabela 7.1 Fatores para determinar os limites de controle para gráficos \bar{X}_{bar} e gráficos S baseados no desvio padrão médio (S_{bar})

N° de técnicos (n)	DP estimado (c_n)	Limites de controle \bar{X}_{bar}		Limites de controle S_{bar}			
		Limite de aviso (A_2)	Limite de ação (A_3)	Limite inferior de ação ($S_{0,999}$)	Limite de aviso inferior ($S_{0,975}$)	Limite de aviso superior ($S_{0,025}$)	Limite superior de ação ($S_{0,001}$)
2	1,253	1,772	2,659	0,002	0,039	2,809	4,124
3	1,128	1,303	1,954	0,036	0,180	2,167	2,966
4	1,085	1,085	1,628	0,098	0,291	1,916	2,527
5	1,064	0,952	1,427	0,160	0,370	1,776	2,286
6	1,051	0,858	1,287	0,215	0,428	1,684	2,129
7	1,042	0,788	1,182	0,263	0,473	1,618	2,017
8	1,036	0,733	1,099	0,303	0,509	1,567	1,932
9	1,032	0,688	1,032	0,338	0,539	1,527	1,864
10	1,028	0,650	0,975	0,368	0,563	1,495	1,809

Quadro 7.2 Determinando os valores para os limites de aviso e controle de ação de um gráfico \bar{X}_{bar}

A tabela abaixo mostra as concentrações de espermatozoides medidas por quatro técnicos em 10 amostras de QC da mesma preparação IQC, juntamente com a média e o desvio padrão calculados para cada amostra.

Amostra:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Concentração de espermatozoides (10^6 per ml)									
Técnico A:	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
Técnico B:	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
Técnico C:	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
Técnico D:	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
Média	38,0	37,5	39,5	40,5	38,0	37,0	42,0	43,5	41,5	39,0
DP	3,27	3,70	2,52	7,42	1,63	3,16	2,16	1,00	5,45	3,74

Para as 10 amostras QC, a média das médias (\bar{X}_{bar}) é:

$(38,0 + 37,5 + \dots + 39,0)/10 = 39,7$, e a média das DP's (S_{bar}) é:

$(3,27 + 3,70 + \dots + 3,74)/10 = 3,40$.

Os valores dos coeficientes $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$ (ver Tabela 7.1) para $n = 4$ são 1,085 e 1,628, respectivamente. Assim, os limites de controle de aviso (dois erros padrão da média) são dados por:

$\bar{X}_{bar} \pm A_{2,n} \times S_{bar} = 39,7 \pm (1,085 \times 3,40) = 39,7 \pm 3,7$, ou 36,0 e 43,3 $\times 10^6$ por ml.

Da mesma forma, os limites de controle de ação (três erros padrão da média) são dados por:

$\bar{X}_{bar} \pm A_{3,n} \times S_{bar} = 39,7 \pm (1,628 \times 3,40) = 39,7 \pm 5,5$, ou 34,2 e 45,2 $\times 10^6$ por ml.

Quadro 7.3 Método alternativo para calcular os limites de controle \bar{X}_{bar} a partir do desvio padrão combinado

A estimativa do desvio padrão entre técnicos também pode ser obtida multiplicando S_{bar} por c_n (= 1,085 por amostra tamanho 4 (Tabela 7.1)) dando 3,69. Isso se aproxima do valor diretamente computado de 3,84 do desvio padrão combinado, $s = \sqrt{((s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_{10}^2)/10)}$, onde s_i é o desvio padrão da amostra QC. Esse resultado pode ser usado para calcular diretamente os limites de controle de ação e aviso, com 2 e 3 erros padrão (s/\sqrt{n}) a ambos os lados da média. Neste exemplo, esses limites de aviso são 35,8 e 43,5 $\times 10^6$ por ml, e os limites de ação são 33,9 e 45,5 $\times 10^6$ por ml, respectivamente - muito próximos daqueles obtidos usando S_{bar} , $A_{2,n}$ e $A_{3,n}$.

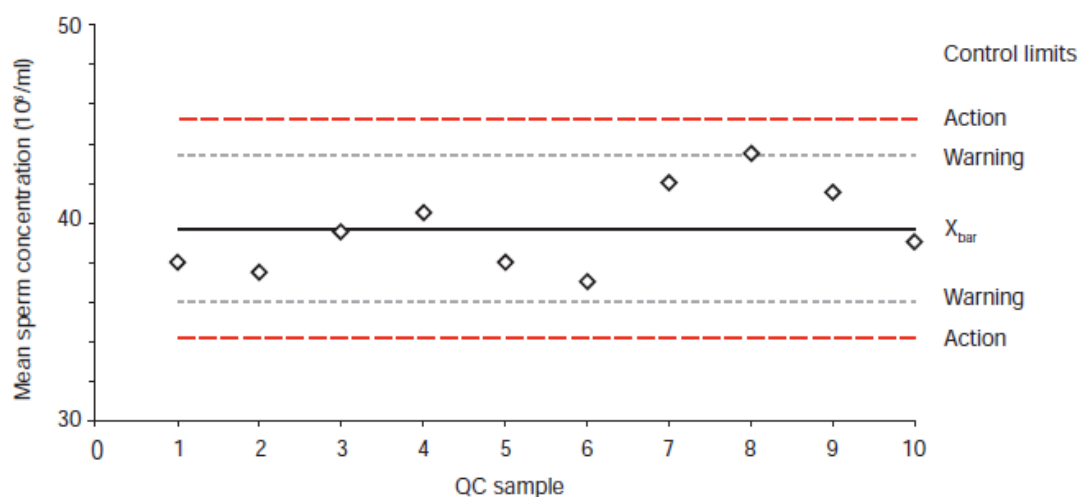
7.7.1.2 Fazendo o gráfico \bar{X}_{bar}

Cada técnico deve analisar as amostras do IQC e contribuir para o gráfico de controle do IQC. Uma vez que um procedimento de ensaio esteja em vigor com variação aceitável, as amostras IQC devem ser analisadas rotineiramente e os resultados comparados com os valores estabelecidos. Isso é feito incluindo os valores médios medidos para as amostras IQC em cada ensaio no gráfico de controle e observando se eles estão fora da variabilidade (erro) determinada para o método no laboratório. Veja a Fig. 7.1 para um exemplo.

Os gráficos \bar{X}_{bar} podem ser construídos, e os limites de alerta e ação definidos, para a avaliação da motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, seguindo os passos descritos para a concentração espermática, com a diferença de que os percentuais são avaliados (ver Seção 7.8).

Fig. 7.1 Um gráfico \bar{X}_{bar} para concentração de espermatozoides

Os valores médios das medições sequenciais (\diamond) são incluídos em um gráfico mostrando o valor alvo medido anteriormente (\bar{X}_{bar}) e os limites de alerta e ação.



Mean sperm concentration (10 ⁶ /ml)	Concentração média de espermatozoides (10 ⁶ /ml)
QC sample	Amostra QC
Control limits	Limites de controle
Action	Ação
Warning	Alerta
\bar{X}_{bar}	\bar{X}_{bar}
Warning	Alerta
Action	Ação

7.7.2 O gráfico S

Este gráfico detecta se os técnicos estão produzindo resultados altamente variáveis. Medições repetidas são feitas e os desvios padrão são traçados contra o tempo. Como as amostras de QC são todas do mesmo conjunto armazenado, não são esperadas diferenças entre amostras, portanto, quaisquer diferenças significativas entre os técnicos sugeririam vies sistemáticos na avaliação de um ou mais técnicos.

7.7.2.1 Calculando os limites de controle do gráfico S

Os limites de controle são adicionados ao gráfico S da mesma maneira que para o gráfico \bar{X} . No entanto, como a distribuição do desvio padrão não é simétrica, os limites de alerta e ação são escolhidos de forma que a probabilidade de que uma nova observação fique fora dos limites de controle é a mesma do que no gráfico \bar{X} se não houver alterações na exatidão ou na precisão. Assim, os limites de alerta e ação estarão cruzados em 5% e 0,2%, respectivamente, das amostras futuras, como resultado apenas da variação aleatória. Estes limites são determinados a partir da distribuição χ^2 , e os fatores $s_{\alpha,n}$ usados para multiplicar o desvio padrão médio $S_{\bar{bar}}$ são apresentados na Tabela 7.1. Um exemplo trabalhado é mostrado no Quadro 7.4. Os resultados que caem abaixo dos limites inferiores no gráfico S sugerem uma variação inesperadamente pequena, o que pode indicar uma melhoria genuína no nível de concordância entre técnicos, ou possível conluio.

Quadro 7.4 Determinando os valores para os limites de aviso e controle de ação de um gráfico S

Usando os resultados do Quadro 7.2, o desvio padrão médio da amostra $S_{\bar{bar}}$ é $3,40 \times 10^6$ por ml.

Os valores de $s_{\alpha,n}$ para $n = 4$ são lidos da Tabela 7.1 para dar:

o limite inferior de ação $S_{\bar{bar}} \times s_{0,999,4} = 3,40 \times 0,098 = 0,33 \times 10^6$ por ml,

o limite inferior de aviso $S_{\bar{bar}} \times s_{0,975,4} = 3,40 \times 0,291 = 0,99 \times 10^6$ por ml,

o limite superior de aviso $S_{\bar{bar}} \times s_{0,025,4} = 3,40 \times 1,916 = 6,51 \times 10^6$ por ml, e

o limite superior de ação $S_{\bar{bar}} \times s_{0,001,4} = 3,40 \times 2,527 = 8,59 \times 10^6$ por ml.

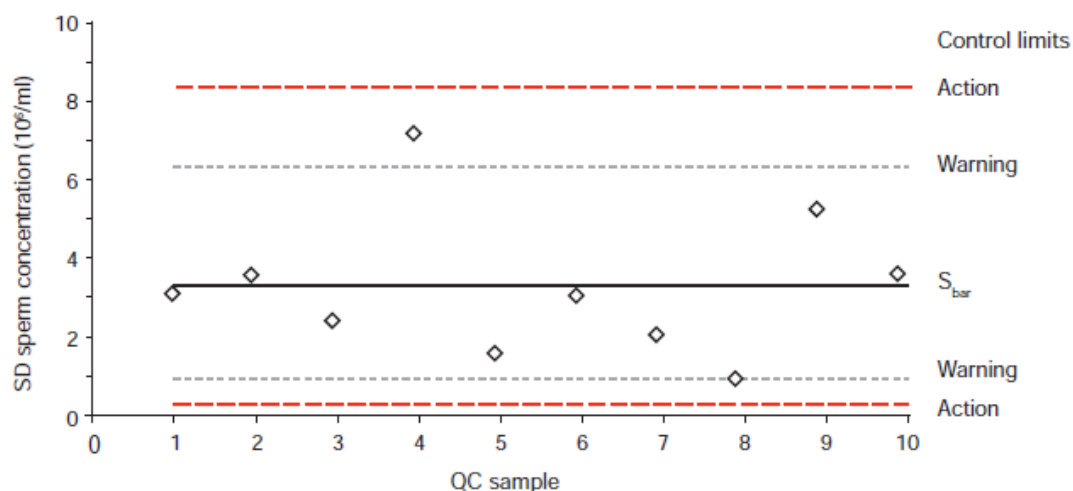
7.7.2.2 Fazendo o gráfico S

Os valores subsequentes do desvio padrão são incluídos no gráfico de controle para determinar se eles estão fora da variabilidade (erro) determinada para o método no laboratório. Veja a Fig. 7.2 para um exemplo.

Os gráficos S podem ser construídos, e os limites de alerta e ação definidos, para a avaliação da motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, seguindo os passos descritos para a concentração espermática, com a diferença de que os percentuais são avaliados (ver Seção 7.8).

Fig. 7.2 Um gráfico S para concentração de espermatozoides

Os desvios padrão para medições sequenciais (\diamond) são incluídos em um gráfico mostrando o valor médio medido anteriormente ($S_{\bar{bar}}$) e os limites de alerta e ação.



SD sperm concentration (10 ⁶ /ml)	Concentração espermática do DP (10 ⁶ /ml)
QC sample	Amostra QC
Control limits	Limites de controle
Action	Ação
Warning	Alerta
$S_{\bar{b}}$	$S_{\bar{b}}$
Warning	Alerta
Action	Ação

7.8 QC para percentagens

Quando os espermatozoides são classificados em duas ou mais classes (como morfologia normal ou anormal, motilidade progressiva ou não progressiva, vivos ou mortos), o erro padrão da percentagem estimada dentro de uma classe depende da percentagem verdadeira, mas desconhecida, e também do número de espermatozoides contados (N). A estimativa aproximada comum do erro padrão de uma proporção, p , é $\sqrt{p(100-p)/N}$ para valores na faixa de 20% a 80%. Fora deste intervalo, um método mais apropriado para usar é a transformação angular (raiz quadrada de arco seno), $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$, para o qual o desvio padrão é $1/(2\sqrt{N})$ radianos, isto é, dependente apenas no número de espermatozoides contados e não na percentagem real (ver Kuster et al., 2004).

Enquanto o desvio padrão das leituras individuais deve ser próximo a esses valores, o desvio padrão médio ($S_{\bar{b}}$) excederá 2,5%, devido à variação adicional entre os técnicos. Neste caso, o objetivo será reduzir o $S_{\bar{b}}$.

7.9 Avaliando os gráficos \bar{X} e S

Os técnicos e o supervisor de laboratório devem revisar juntos os gráficos de controle. Se os valores de controle não forem aceitáveis, uma avaliação sistemática de todo o procedimento deve ser conduzida para determinar as possíveis fontes de variação.

7.9.1 Como reconhecer valores fora de controle

Existem diretrizes básicas para monitorar o controle de qualidade dos procedimentos. Os gráficos de controle de qualidade devem ser examinados à luz dessas diretrizes e medidas devem ser tomadas quando indicado. Existem várias regras para declarar que um método está fora de controle, incluindo as seguintes:

- Um único ponto está fora do DP 3 dos limites de controle. Esta é a regra mais simples e parece ser universalmente adotada. Pode indicar uma grande mudança repentina no processo.
- Dois dos três pontos consecutivos estão fora dos limites de controle de ação.
- Quatro dos cinco pontos consecutivos estão fora dos limites de controle de aviso.
- Dois resultados consecutivos estão acima dos limites de controle de aviso superiores ou abaixo dos limites inferiores.
- Dois resultados consecutivos estão um acima do limite de controle de aviso superior e um abaixo do limite inferior.
- Oito pontos consecutivos estão no mesmo lado da linha central. Essa regra é atraente porque é simples de aplicar e é sensível a mudanças graduais ou tendências que a primeira regra pode perder.

Na prática, o uso da primeira e última destas regras é geralmente aceito. Se a amostra de QC for “rejeitada”, a sensibilidade do alarme aos diferentes tipos de erros (aleatórios ou sistemáticos) deve direcionar a investigação para possíveis causas (ver Quadro 7.5). O supervisor do laboratório deve rever regularmente os resultados do QC.

Quadro 7.5 Regras de controle básicas para gráficos de controle de qualidade

Regra de controle	Erro indicado
Um resultado fora dos limites de ação	Aleatório
Dois de três pontos fora dos limites de controle de ação	Sistemático
Quatro dos cinco pontos fora dos limites de controle de aviso	Sistemático
Dois resultados consecutivos, ambos acima ou ambos abaixo dos limites de aviso superior/inferior	Sistemático
Dois resultados consecutivos, um acima e outro abaixo do limite superior/inferior de aviso	Aleatório
Oito resultados consecutivos, todos acima ou abaixo da média	Sistemático

7.9.2 Causas de valores fora de controle

Sinais do procedimento de QC devem ser cuidadosamente avaliados e quaisquer erros de procedimento identificados. Possíveis erros incluem:

- Mistura inadequada da amostra (comum com amostras viscosas e aglutinadas);
- Estresse técnico (por exemplo, erro errático de amostragem ou registro);
- Técnica inadequada (por exemplo, pipetagem descuidada ou manuseio durante a preparação de lâminas ou câmaras) (ver Seção 7.13);
- Treinamento inadequado (por exemplo, diferenças sistemáticas na identificação de espermatozoides para contagem, classificação da morfologia normal, avaliação de espermatozoides rosados e brancos ou caudas espermáticas em espiral para vitalidade espermática e detecção de espermatozoides móveis; desvios de erros de cálculo consistentes) (ver Seção 7.13);

- Variação do instrumento (por exemplo, pipetas automáticas gastas ou não calibradas, que podem reduzir a reprodutibilidade durante a amostragem e a diluição; microscópios desalinhados, que podem reduzir a claridade óptica e impedir a pontuação adequada da vitalidade ou morfologia; balanças ou cilindros de medição imprecisos) (ver Apêndice 7, Seção A7.8);
- Deterioração das amostras de QC;
- Mudança de equipamento, particularmente pipetas e câmaras de contagem;
- Mudança nos procedimentos ou no ambiente laboratorial.

7.9.3 Respostas a valores fora de controle

Quando os resultados estão fora dos limites de controle, a causa provável e a ação corretiva adotada devem ser registradas. Se o problema não for óbvio, reanalise as amostras de QC para verificar se o primeiro resultado foi incomum. Se o resultado do QC permanecer fora dos limites de controle, a causa deve ser encontrada e corrigida antes que novos ensaios sejam realizados.

Para fazer isso:

- Crie um fluxograma de todo o processo, passo a passo. O SOP e as Tabelas 7.2 a 7.5 podem ajudar nesse processo.
- A partir do fluxograma, identifique áreas de variação potencial, deduza possíveis causas e desenvolva um plano para reduzir a variação.
- Colete mais dados, crie novos gráficos de controle e revise-os para determinar se a variabilidade é aceitável para o procedimento. Essa sequência de identificação de problemas, desenvolvimento e teste de uma hipótese e reavaliação do processo é conhecida como o ciclo Shewhart ou PDCA (planejar, fazer, verificar, agir).

7.10 Procedimentos estatísticos para analisar e informar a variabilidade do técnico

Os procedimentos de QC baseados na avaliação de amostras de sêmen frescas são semelhantes aos das amostras armazenadas e permitem que a variabilidade dentro e entre os técnicos seja avaliada. No entanto, como o valor real não é conhecido, o gráfico \bar{X} não pode ser usado e o erro sistemático (viés técnico) não pode ser estimado. Aqui, os procedimentos primários de QC são o gráfico S para avaliar a variabilidade entre técnicos e a análise de variância bidirecional (ANOVA) para avaliar as diferenças sistemáticas entre os técnicos após cada cinco ou 10 amostras de QC.

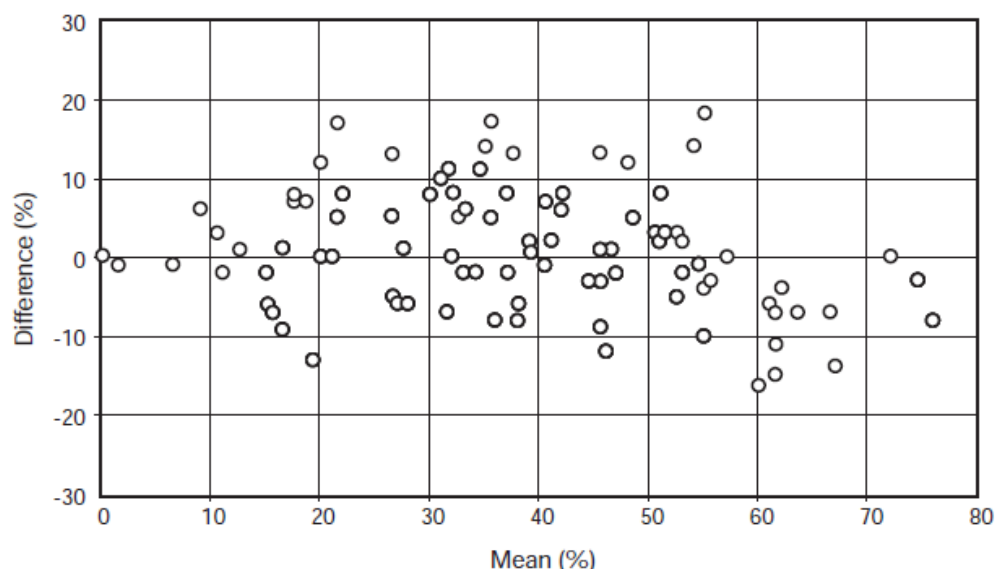
7.10.1 Comparando os resultados de dois ou mais técnicos

Os resultados de dois ou mais técnicos podem ser comparados de várias maneiras.

- Traçando a diferença entre duas estimativas contra sua média (Bland & Altman, 1986). Uma comparação das estimativas de concentração espermática por dois técnicos, da mesma amostra, deve produzir um padrão semelhante ao da Fig. 7.3, onde estimativas de motilidade espermática por um técnico e um computador são compatíveis.

Fig. 7.3 Um gráfico Bland–Altman de estimativas manuais e do sistema CASA da porcentagem de motilidade espermática progressiva

O gráfico mostra a diferença entre os resultados com os dois métodos (manual - CASA) contra a média $((\text{manual} + \text{CASA})/2)$.



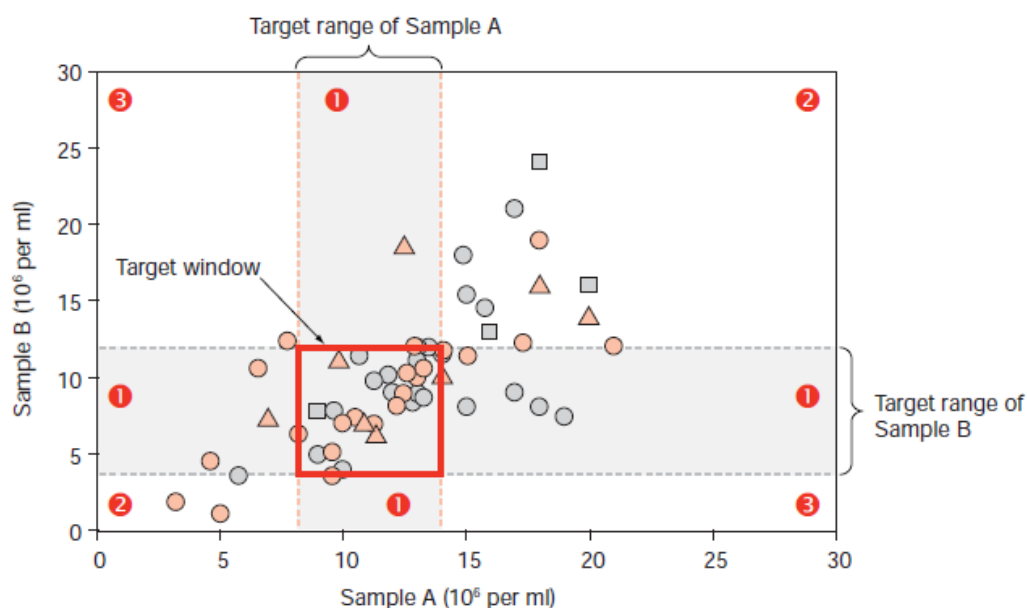
Difference (%)	Diferença (%)
Mean (%)	Média (%)

Dados cortesia de HWG Baker.

- Calculando a média e DP das diferenças (comparações pareadas). Como a mesma amostra é analisada por ambos os técnicos, a diferença entre as médias deve ser zero. Qualquer diferença significativa de zero, avaliada por um teste t pareado, revela viés (diferença sistemática) entre os dois técnicos.
- Resultados traçados de duas amostras, uma contra a outra, (gráficos de Youden). Uma comparação de estimativas de concentração por vários técnicos, cada um examinando dois espécimes separados, deve produzir um padrão semelhante ao da Fig. 7.4. Para cada técnico (para IQC) ou cada centro (para EQC), os valores para os dois espécimes são traçados um contra o outro. As linhas horizontais e verticais pontilhadas indicam os limites de confiança de 95% dos resultados de técnicos experientes (IQC) ou laboratórios de referência (EQC). A área definida pela interseção dessas linhas é a janela alvo na qual os valores devem cair. Este gráfico revela erros aleatórios quando o valor para uma amostra está no intervalo correto enquanto o valor para a outra amostra não está (marcado 1) e erros sistemáticos quando as duas estimativas são muito altas (painel superior direito, marcado com 2) ou muito baixo (painel inferior esquerdo, marcado 2). Erros aleatórios provavelmente contribuem para que uma amostra seja muito baixa e a outra muito alta (marcada com 3).

Fig. 7.4 Gráfico de estimativas de Youden da concentração de espermatozoides

Resultados de análises de duas amostras (A, B) por vários técnicos, traçadas entre si. Os resultados para cada técnico (ou laboratório em EQC) podem ser mostrados por diferentes símbolos e cores. Os resultados em painéis marcados com **2** são provavelmente devidos a erros sistemáticos, enquanto aqueles em painéis marcados com **1** e **3** provavelmente são devidos a erros aleatórios.



Sample B (10^6 per ml)	Amostra B (10^6 por ml)
Sample A (10^6 per ml)	Amostra A (10^6 por ml)
Target range of Sample A	Faixa alvo da amostra A
Target range of Sample B	Faixa alvo da amostra B
Target window	Janela alvo

- Análise de variância bidirecional. Esta técnica é descrita em muitos livros de estatística (por exemplo, Armitage et al., 2002) e está disponível em programas de computador, juntamente com testes estatísticos para a significância das diferenças entre os técnicos. Assim como na comparação pareada acima, as diferenças entre as estimativas de todos os técnicos devem ser zero. Assim, as diferenças do valor médio são calculadas para cada amostra e para cada técnico, e a média e o desvio padrão dessas diferenças são computados para cada técnico. O viés é indicado para técnicos para os quais o valor absoluto da diferença é superior a 3 erros padrão da diferença média.

Um teste estatístico formal para diferenças entre técnicos é baseado no teste F da análise de variância bidirecional, que pode ser obtido diretamente da maioria dos programas de computador de estatística. A raiz quadrada média do erro (σ) é a raiz quadrada do quadrado médio residual, ou erro, da análise da tabela de variância. Diferenças médias maiores que cerca de 2,5 erros padrão provavelmente não resultam da variação do acaso (<1,2%). Se as diferenças entre os técnicos são significativas ou não, é necessário rever as médias dos técnicos ou as diferenças de médias para identificar quais são maiores do que o esperado. Nem todos os programas para computador fornecem o erro padrão das diferenças entre os técnicos, que podem ter que ser calculados separadamente. Diferenças substanciais entre os técnicos devem levar a uma revisão de todos os procedimentos para identificar como a consistência pode ser melhorada.

O exemplo trabalhado no Quadro 7.6 ilustra como calcular diretamente o erro padrão das diferenças entre os técnicos na concentração de espermatozoides e avaliar se eles são maiores do que o esperado com a variação do acaso. Ao realizar cálculos diretamente das observações, um número suficiente de casas decimais deve ser mantido para evitar erros de arredondamento.

7.10.2 Monitorando médias mensais

Enquanto os procedimentos primários de IQC são baseados na avaliação das diferenças entre e dentro dos técnicos, informações adicionais podem ser obtidas através do monitoramento das tendências nos resultados da análise do sêmen.

Os valores médios de cada variável para todos os pacientes examinados durante um determinado período (por exemplo, mensalmente) podem ser traçados no \bar{X} , com limites de alerta e ação 2 e 3 erros padrão de cada lado da média. O erro padrão pode ser estimado a partir do desvio padrão das observações originais dividido pela raiz quadrada do número de análises de sêmen em cada intervalo, ou diretamente da distribuição observada da média. Os limites de controle devem ser determinados usando observações de pelo menos 6 meses e devem ser revisados regularmente. Deve haver pelo menos 20 resultados para cada média; um pequeno laboratório pode ter que reunir resultados de mais de 1 mês. Refinamentos para o método incluem monitoramento de médias mensais de pacientes com valores normais e o uso de gráficos de soma cumulativa (CUSUM) para a detecção rápida de quaisquer desvios sistemáticos da média (Barnett, 1979).

Desvios dos valores esperados podem refletir características diferentes do cliente (mudanças dependentes do tempo nos homens sendo analisados; uma mudança no número de testes repetidos nos mesmos homens; mudanças no padrão de referência de homens com diferentes tipos de infertilidade) ou fatores técnicos (mudanças em técnicos, suprimentos de laboratório, variações sazonais de temperatura, etc.).

7.11 Controle de qualidade externo e garantia de qualidade

O controle externo de qualidade (EQC) é parte integrante do processo completo de QC (Cekan et al., 1995) que monitora os resultados dos ensaios, enquanto a garantia externa de qualidade (EQA) monitora todos os procedimentos laboratoriais relacionados à coleta e ao informe de dados para garantir que os processos do laboratório estão sob controle. O EQC permite que um laboratório compare seus resultados com os de outros. Permite que diferentes métodos sejam avaliados e comparados em uma escala não possível em um único laboratório.

EQC e IQC são processos complementares. O EQC pode revelar problemas com a exatidão que podem não ser aparentes no IQC se as amostras de controle não forem adequadamente mascaradas ou selecionadas. O EQC tem a vantagem de permitir que um laboratório monitore a exatidão e a estabilidade de seus métodos (Plaut & Westgard, 2002). No entanto, como as amostras EQC são claramente de origem externa, elas podem ser manuseadas de uma maneira especial; isso deve ser protegido para que eles sejam processados o máximo possível da mesma maneira que as amostras de rotina.

Quadro 7.6 Avaliando diferenças sistemáticas entre técnicos

A tabela abaixo mostra as concentrações espermáticas estimadas por três técnicos em cinco amostras de QC. Concentração de espermatozoides (10^6 per ml)

Amostra	1	2	3	4	5
Técnico A	108	45	100	50	92
Técnico B	103	47	102	50	96
Técnico C	104	46	89	41	88
Média da amostra	105	46	97	47	92

As diferenças da média da amostra (d_{ij}) são calculadas subtraindo a média da amostra de sêmen de cada observação:

Amostra	1	2	3	4	5
Técnico A	3,0	-1,0	3,0	3,0	0,0
Técnico B	-2,0	1,0	5,0	3,0	4,0
Técnico C	-1,0	0,0	-8,0	-6,0	-4,0

A média, $m_i = \sum d_{ij}/n$, e o desvio padrão, $s_i = \sqrt{(\sum d_{ij}^2/(n-1))}$, dessas diferenças são computadas para cada técnico, onde n é o número de amostras de sêmen.

	Média (m_i)	DP (s_i)	Média/erro padrão ($m_i/se(m_i)$)
Técnico A	1,600	1,949	1,836
Técnico B	2,200	2,775	1,773
Técnico C	-3,800	3,347	-2,539

Para o técnico C, a diferença média da média da amostra é $-3,8 \times 10^6$ por ml, ou 5,7 $(-3,8 - (1,6 + 2,2)/2) \times 10^6$ por ml inferior à média dos outros dois técnicos. Para avaliar se o grau de subestimação é compatível com a variação do acaso, a raiz quadrada média do erro, $\sigma = \sqrt{(\sum s_i^2/(t-1))}$, onde t é o número de técnicos, é calculada a partir dos desvios padrão das diferenças dos técnicos. Neste exemplo, $\sigma = 3,369 \times 10^6$ por ml. O erro padrão da diferença média de cada técnico é dado por $se(m_i) = \sigma \sqrt{((1-1/t)/n)}$, ou $1,230 \times 10^6$ por ml.

O valor absoluto da diferença média do técnico C ($3,8 \times 10^6$ por ml) é maior do que 3 erros padrão e, portanto, é significativamente diferente do valor esperado de zero (assumindo que não há diferenças sistemáticas entre os técnicos).

Um teste estatístico formal de diferenças entre técnicos é baseado no teste F da análise de variância de dois técnicos para técnicos e amostras de QC. A análise da tabela de variância, usando as concentrações de esperma acima, é dada abaixo.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média do quadrado	Razão F	Valor-P
Amostras QC	9807,6	4	2451,90	216,03	< 0,001
Técnicos	109,2	2	54,60	4,81	0,042
Erro	90,8	8	11,35		
Total	10007,6	14			

O quadrado médio da raiz do erro é $\sqrt{11,35} = 3,369 \times 10^6$ por ml, o mesmo que o obtido acima. Como esperado, as diferenças entre as amostras de QC são muito grandes ($P < 0,001$) uma vez que são retiradas de diferentes amostras de sêmen fresco. O teste F para diferenças entre técnicos ($F = 4,81$ com 2 e 8 graus de liberdade, $P = 0,042$) é significativo no nível 0,05 e sugere que essas diferenças são maiores do que seria esperado apenas da variação aleatória.

Quadro 7.7 Principais características dos procedimentos em Controle de Qualidade

Procedimento	Erros detectados	Material de QC	Nº de técnicos
Gráfico \bar{X}	Viés, variabilidade global, exatidão	Armazenado	Individual, vários
Gráfico S	Viés/precisão	Armazenado/fresco	Vários
ANOVA de duas vias	Viés/precisão	Armazenado/fresco	Vários
Bland–Altman	Viés/precisão	Armazenado/fresco	Dois
Testes emparelhados	Viés/precisão	Armazenado/fresco	Dois
Gráficos de Youden	Viés/precisão	Armazenado/fresco	Vários

A EQC engloba programas de comparação de pares e testes de proficiência nos quais amostras supostamente idênticas são enviadas a todos os laboratórios participantes para análise (Cembrowski & Carey, 1989). Os laboratórios enviam seus resultados para uma instalação central, onde os dados são examinados procurando discrepâncias, e médias e desvios-padrão são calculados para caracterizar o desempenho dos laboratórios participantes. Uma lista de programas nacionais de EQC para análise de sêmen é fornecida no Apêndice 8.

7.11.1 Avaliação dos resultados do Controle de Qualidade Externo

Esquemas EQC fornecem aos laboratórios informações sobre os seus resultados e os de outros laboratórios participantes. Deve ser determinado se os valores-alvo especificados foram obtidos a partir de medições precisas, de múltiplas contagens hemocitométricas de concentração de espermatozoides, de análise de motilidade espermática auxiliada por computador e se os resultados foram obtidos de um grupo de laboratórios de referência bem controlados ou são ajustados de todos os centros participantes. Os resultados são frequentemente apresentados graficamente, em um gráfico de barras. Se a mesma amostra EQC for usada em várias ocasiões, o viés e a variabilidade dos resultados do laboratório nesta amostra também serão informados.

Quando duas amostras são fornecidas para análise, um gráfico de Youden é frequentemente feito em que os valores para cada amostra são incluídos nos eixos x e y (ver Fig. 7.4). A extensão em que os centros diferem em sua avaliação é claramente vista pela dispersão e distribuição dos valores incluídos. Dados adicionais podem ser visualizados, por exemplo, usando símbolos ou cores diferentes para indicar o uso de diferentes métodos (câmaras de contagem, corantes ou critérios de avaliação) ou diferentes centros.

Quando mais de duas amostras são distribuídas, vários aspectos do viés (a diferença do valor designado) podem ser dados. Esses incluem:

- O índice de viés (BIS): viés dividido por um coeficiente de variação escolhido $\times 100$, que pode ser positivo ou negativo;
- O índice de variação (VIS): é semelhante ao BIS, mas é sempre positivo;
- As pontuações médias do BIS ou do VIS (MRBIS, MRVIS), são as que ajudam a determinar as tendências.

MRBIS e MRVIS baixos indicam que os resultados estão próximos dos valores designados; um MRBIS baixo, mas um MRVIS alto poderia indicar erro aleatório; e MRBIS e MRVIS altos indicam erros sistemáticos. Os resultados relatados como

bem-sucedidos/malsucedidos ou como classificações são úteis para inspeção e certificação do laboratório.

Uma maneira simples de monitorar o desempenho é incluir os resultados do laboratório (no eixo y) em relação ao valor alvo (no eixo x) para cada parâmetro. Isso mostra claramente quão perto da linha de identidade caem os valores do laboratório. Alternativamente, as diferenças dos valores alvo podem ser mostradas em um gráfico de Bland–Altman (ver Fig. 7.3).

7.11.2 Respostas a resultados fora de controle

As informações essenciais derivadas dos programas EQC estão relacionadas ao viés ou à exatidão dos laboratórios e métodos laboratoriais. O resultado desejado é que os laboratórios mantenham ou melhorem a exatidão de seus métodos (Plaut & Westgard, 2002). Laboratórios com resultados que são persistentemente maiores ou menores que o valor atribuído, ou a média do esquema EQC, precisam reavaliar seus métodos. Uma ampla variação nos resultados do EQC é geralmente associada a uma ampla variação nos resultados do IQC e indica inconsistências nos procedimentos de avaliação de amostra para amostra. Os procedimentos técnicos devem ser cuidadosamente reavaliados para garantir que estejam de acordo com as recomendações deste manual.

Ações apropriadas incluem aquelas discutidas para o IQC (ver Seção 7.9.3) com um novo treinamento e um novo teste. As Tabelas 7.2–7.5 também indicam possíveis fontes de variação na análise de esperma e as soluções propostas. O intercâmbio de pessoal científico entre laboratórios é frequentemente útil e a formação de técnicos em laboratórios com bons resultados de EQC pode ser benéfica. Um consultor de um laboratório com bons resultados de EQC poderá, muitas vezes, ver onde os métodos podem ser alterados para melhorar a reprodutibilidade.

7.12 Frequência e prioridade do controle de qualidade

As amostras de QC devem ser analisadas rotineiramente. A frequência da análise pode ser determinada por recomendações nacionais ou locais ou por leis de licenciamento laboratorial ou agências de acreditação. Algumas regulamentações exigem que as amostras de QC sejam analisadas a cada dia que as concentrações espermáticas dos pacientes sejam avaliadas; caso contrário, entre 1% e 5% das amostras devem ser para o IQC.

Amostras de QC devem ser usadas:

- Para monitorar funcionários antigos e recém-empregados;
- Toda vez que novos equipamentos de laboratório, suprimentos, procedimentos ou lotes de amostras IQC forem introduzidos.

O quadro 7.8 contém um guia geral para o agendamento de QC; na prática, o cronograma dependerá da carga de trabalho no laboratório. O quadro 7.9 indica a prioridade dos diferentes protocolos de QC; alguns procedimentos podem não ser viáveis para laboratórios com financiamento limitado.

Quadro 7.8 Cronograma para controle de qualidade

Em todo momento	vigilância e correlação dos resultados dentro das amostras
Semanal/mensal	análise de medições replicadas por diferentes técnicos

Mensal/trimestral	análise dos resultados médios
Trimestral/semestral	participação no EQC
Semestral/anual	calibração de pipetas, câmaras de contagem, outros equipamentos

Quadro 7.9 Resumo dos testes de Controle de Qualidade

Parâmetro	Material	Valor alvo	Exatidão, viés	Precisão	Prioridade (1>2>3)
Concentração	IQC fresco	Não		Gráfico S, ANOVA de 2 vias	1
	IQC armazenado	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	3
	EQC	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	2
Morfologia	IQC fresco	Não		Gráfico S, ANOVA de 2 vias	1
	IQC armazenado	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	3
	EQC	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	2
Motilidade	IQC fresco	Não		Gráfico S, ANOVA de 2 vias	1
	IQC armazenado	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	3
	EQC	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	2
Vitalidade	IQC fresco	Não		Gráfico S, ANOVA de 2 vias	1
	IQC armazenado	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	3
	EQC	Sim	Gráfico \bar{X}	Gráfico S	2

7.13 Treinamento

Uma abordagem semelhante ao QC pode ser usada quando os técnicos estão sendo treinados, novos testes introduzidos ou modificações nos métodos existentes avaliados. O treinamento de técnicos deve incluir a conscientização das abordagens descritas abaixo.

7.13.1 Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a concentração de espermatozoides

- Revise os procedimentos de mistura e diluição, grades de câmaras e cálculos.
- Leia as amostras dentro de 10 a 15 minutos após o carregamento da câmara, após o qual a evaporação tem efeitos perceptíveis na posição dos espermatozoides dentro da câmara.
- Dois técnicos devem trabalhar juntos, usando um microscópio de ponte ou microscópio equipado com uma câmera de vídeo e uma tela de TV, comparando os procedimentos de diluição, carregamento e contagem. Eles devem contar a mesma câmara carregada, comparando valores para linhas ou grades, para encontrar a fonte das discrepâncias.
- Use um microscópio de ponte em uma sessão de contagem e treinamento, ou examine os espermatozoides na grade ocular, para decidir se os espermatozoides individuais são considerados em uma linha e devem ser elegíveis para inclusão na contagem.
- Reveja a Tabela 7.2.

Tabela 7.2 Fontes de variação (erro) na avaliação da concentração espermática e soluções propostas

Procedimento	Prevenção	Controle
Mistura incompleta de amostras de sêmen antes de fazer a diluição	Treinamento, SOP	Replicar diluições
Erros de diluição (por exemplo, supondo que uma diluição de 1: 20 é 1 + 20, quando é de fato 1 + 19)	Treinamento, SOP	IQC
Dispositivo de pipetagem fora de calibração (por exemplo, a pipeta é ajustada para 100 µl, mas na verdade mede 95 µl ou 110 µl)	Manutenção de Equipamento, SOP	Replicar diluições, IQC, EQC
Usando uma pipeta inadequada (por exemplo, uma pipeta de ar em vez de uma de deslocamento positivo)	Treinamento, SOP	Replicar diluições, IQC, EQC
Usando um volume baixo para diluição, que carrega um alto risco de amostragem não representativa	Treinamento, SOP	Replicar diluições, IQC, EQC
Não limpar o sêmen residual do lado de fora da ponta da pipeta antes de dispensá-la no diluente	Treinamento, SOP	IQC
Câmara não limpa e seca	Treinamento, SOP	Replicar avaliações
Câmara montada ou carregada incorretamente (por exemplo, partículas de sujeira nos pilares podem alterar a altura da câmara)	Treinamento, SOP	Replicar avaliações
Retardo excessivo entre a mistura de sêmen e a remoção de alíquota para diluição (espermatozoides no sêmen começam a se decantar imediatamente)	Treinamento, SOP	Replicar diluições e avaliações
Retardo excessivo entre a agitação da câmara de diluição e o carregamento (espermatozoides diluídos começam a decantar imediatamente)	Treinamento, SOP	Replicar diluições e avaliações
Microscópio não devidamente limpo ou alinhado. Ampliação incorreta	Treinamento, SOP, Manutenção de Equipamento	IQC e EQC
Não esperar o tempo suficiente após o carregamento da câmara antes da análise (tempo insuficiente para sedimentação)	Treinamento, SOP	Replicar avaliações, IQC, EQC
A câmara do hemocítmetro não está horizontal durante a decantação dos espermatozoides, ou a câmara não está mantida em um ambiente umidificado durante a sedimentação	Treinamento, SOP	Replicar avaliações, IQC, EQC
Identificação incorreta de espermatozoides (por exemplo, contagem de fragmentos como espermatozoides ou espermatozoides pulados por difícil reconhecimento)	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Avaliar poucas ou muitas linhas na grade (ou seja, cálculos incorretos); parando no meio de uma fileira	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Contando muitos poucos espermatozoides, levando a um alto erro de amostragem	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Pontuação inconsistente de espermatozoides nas linhas da caixa de contagem (por exemplo, superestimando a concentração se os espermatozoides são pontuados nas bordas	Treinamento, SOP	IQC, EQC

superior, inferior, esquerda e direita)		
Mau funcionamento do contador de células	Manutenção de Equipamento	IQC, EQC
Erro matemático no cálculo, ou correção da diluição	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Uso de uma câmara cheia de capilares (distribuição desigual de espermatozoides durante o preenchimento)	Treinamento, SOP	IQC, EQC

7.13.2 Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a morfologia dos espermatozoides

- Siga as orientações deste manual: estude as micrografias e o comentário relevante para cada espermatozoide.
- Preste especial atenção aos espermatozoides com morfologia limítrofe; estes devem ser classificados como anormais.
- Realize uma sessão de pontuação e treinamento usando um microscópio de ponte ou microscópio equipado com uma câmera de vídeo e uma tela de TV.
- Reveja a Tabela 7.3.

Tabela 7.3 Fontes de variação (erro) na avaliação da morfologia dos espermatozoides e soluções propostas

Procedimento	Prevenção	Controle
Microscópio não devidamente limpo ou alinhado. Ampliação incorreta	Treinamento, SOP, Manutenção de Equipamento	IQC, EQC
Treinamento inadequado antes de executar a análise	Treinamento	IQC, EQC
Técnicas subjetivas sem diretrizes claras	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Influências sutis de colegas em sistemas de classificação (podem causar mudanças durante a análise)	Treinamento	IQC (gráficos de controle)
Sêmen inadequadamente misturado quando o esfregaço foi preparado	Treinamento, SOP	IQC
Má preparação do esfregaço (ou seja, muito grosso ou muito fino)	Treinamento, SOP	IQC
Técnica de coloração deficiente (por exemplo, coloração clara, escura ou excessiva)	Treinamento, SOP	IQC
Avaliação de espermatozoides na borda da lâmina	Treinamento, SOP	IQC
Tentando marcar espermatozoides que não são planos, ou estão se sobrepondo a outros espermatozoides	Treinamento, SOP	IQC
Não marcar todos os espermatozoides na área, mas selecionar espermatozoides para avaliação	Treinamento, SOP	IQC
Desvanecimento da coloração ao longo do tempo (para amostras IQC armazenadas)	Treinamento, SOP	IQC (gráfico de controle)
Erros no cálculo de percentuais, se não contados em múltiplos de 100	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Mau funcionamento do contador de células	Manutenção de Equipamento	IQC, EQC

7.13.3 Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a motilidade dos espermatozoides

- Faça a preparação imediatamente antes de avaliar. Leia somente após qualquer deslocamento ter parado para reduzir o viés na mobilidade geral.
- Selecione o campo aleatoriamente e não selecione deliberadamente campos com números altos ou baixos de espermatozoides móveis. Uma maneira de fazer isso é evitar olhar pelas oculares até que um campo tenha sido selecionado.
- Não espere que espermatozoides móveis entrem em campo antes de começar a contar.
- Analise rápido; analise apenas uma pequena parte da grade em um momento, dependendo da concentração de espermatozoides.
- Gaste menos tempo examinando uma área da grade, para evitar a contagem de espermatozoides que nadem dentro da área durante a análise.
- Conte espermatozoides progressivos, não progressivos e imóveis em duas etapas. Se houver problemas com a técnica, inverta a ordem da análise.
- Reveja a Tabela 7.4.

Tabela 7.4 Fontes de variação (erro) na avaliação da motilidade dos espermatozoides e soluções propostas

Procedimento	Prevenção	Controle
Mistura incorreta da amostra antes da remoção da alíquota	Treinamento, SOP	Replicar amostragem e avaliação, IQC
Esperar muito tempo entre a preparação da lâmina e a análise (os espermatozoides perdem vigor rapidamente)	Treinamento, SOP	Replicar amostragem e avaliação, IQC
Temperatura inadequada do aquecedor (por exemplo, temperatura muito alta matará os espermatozoides)	Treinamento, SOP, Manutenção de Equipamento	IQC
Microscópio não devidamente limpo ou alinhado. Ampliação inadequada	Treinamento, SOP, Manutenção de Equipamento	IQC, EQC
Falta de grade na ocular para orientação	Equipamento	IQC (gráfico de controle)
Analisar em torno das bordas da lamela (os espermatozoides morrem ou ficam lentos em torno dos 5 mm externos da lamínula)	Treinamento, SOP	Replicar avaliações, IQC
Fazer a avaliação devagar demais (outros espermatozoides nadarão na área definida durante o período de avaliação)	Treinamento, SOP	IQC
Mau funcionamento do contador de células	Manutenção de Equipamento	IQC, EQC
Erros no cálculo de percentuais, se não contados em múltiplos de 100	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Viés subjetivo (ou seja, % de movimento muito alto ou muito baixo consistentemente)	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Procedimentos preparativos que reduzem a motilidade (por exemplo, mudança de temperatura, mistura vigorosa, contaminação com toxinas)	SOP	IQC
Seleção não aleatória de campos para análise. Atraso na análise (por exemplo, esperar até	Treinamento, SOP	IQC, EQC

que os espermatozoides móveis nadem no campo ou na grade para iniciar a análise)		
--	--	--

7.13.4 Dicas práticas ao experimentar dificuldades em avaliar a vitalidade dos espermatozoides

- Preste especial atenção à distinção entre cabeças de espermatozoides vermelhas (mortas) e rosa (vivas) (os espermatozoides com fraca coloração rosa da cabeça são avaliados como vivos). Se o corante é limitado a uma parte da região do pescoço, e o resto da área da cabeça não é corada, é considerado como uma "membrana do pescoço com vazamento", mas não um sinal de morte celular e desintegração total da membrana.
- Considere o uso do método eosina-nigrosina (veja Seção 2.6.1).
- Reveja a Tabela 7.5.

Tabela 7.5 Fontes de variação (erro) na avaliação da vitalidade dos espermatozoides e soluções propostas

Procedimento	Prevenção	Controle
Microscópio não devidamente limpo ou alinhado. Ampliação inadequada	Treinamento, SOP, Manutenção de Equipamento	IQC, EQC
Coloração inadequada: algumas receitas dão condições hipoosmóticas que matam os espermatozoides	Treinamento, SOP	Comparação com motilidade
Esperando muito tempo para corar	Treinamento, SOP	Comparação com motilidade
A reidratação do esfregaço seco, se não for montado diretamente, permitirá que a coloração vaze a todos os espermatozoides	Treinamento, SOP	Comparação com motilidade
Superestimação de espermatozoides mortos (por exemplo, contando como cabeças de espermatozoides mortos aqueles com coloração rosa-fraco)	Treinamento, SOP	IQC, EQC
Avaliação de espermatozoides com coloração rosa restrita ao pescoço como morta	Treinamento, SOP	IQC, EQC

Referências

REFERÊNCIAS

- Abraham-Peskir JV et al. (2002). Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Human Reproduction*, 17: 375-382.
- Abshagen K et al. (1998). Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 70: 355-356.
- Agarwal A et al. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8: 616-627.
- Aitken RJ, Baker HW (1995). Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? *Human Reproduction*, 10: 1736-1739.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81: 459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9: 367-376.
- Aitken RJ, Elton RA (1986). Application of a Poisson-gamma model to study the influence of gamete concentration on sperm-oocyte fusion in the zona-free hamster egg penetration test. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78: 733-739.
- Aitken RJ, Krausz CG (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122: 497-506.
- Aitken RJ, West KM (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13: 433-451.
- Aitken RJ et al. (1983). Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in-vitro fertilization. In: Beier H, Lindner H, eds, *Fertilization of the human egg in vitro: Biological basis and clinical application*. Berlin, Springer: 147-168.
- Aitken RJ et al. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology*, 151: 466-477.
- Aitken RJ et al. (1993). Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *Journal of Andrology*, 14: 132-141.
- Aitken RJ et al. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online*, 7: 65-70.
- Aitken RJ et al. (2004). Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *Journal of Andrology*, 25: 455-465.
- Alvarez C et al. (2003). Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction*, 18: 2082-2088.
- Alvarez JG et al. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8: 338-348.
- Andersen AG et al. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 15: 366-372.
- Armitage P et al. (2002). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Auger J, Eustache F (2000). Standardisation de la classification morphologique des spermatozoides humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologia*, 10: 358-373.

- Auger J et al. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332: 281-285.
- Auger J et al. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human Reproduction*, 16: 2710-2717.
- Aziz N et al. (1996). The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 66: 1000-1008.
- Aziz N et al. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81: 349-354.
- Baker HW, Kovacs GT (1985). Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *International Journal of Andrology*, 8: 421-426.
- Barnett RN (1979). *Clinical laboratory statistics*, 2nd ed. Boston, Little, Brown.
- Barratt CLR et al. (1992). The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Human Reproduction*, 7: 95-98.
- Barratt CLR et al. (1993). Prognostic significance of computerized motility analysis for in-vivo fertility. *Fertility and Sterility*, 60: 520-525.
- Bedford JM (1977). Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record*, 188: 477-487.
- Behre HM et al. (2000). Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology, male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Springer: 92.
- Berman NG et al. (1996). Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *Journal of Andrology*, 17: 68-73.
- Biggers JD et al. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Björndahl L, Barratt CL (2005). Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *Journal of Andrology*, 26: 11.
- Björndahl L, Kvist U (2003). Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive Biomedicine Online*, 7: 440-448.
- Björndahl L et al. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18: 813-816.
- Björndahl L et al. (2004). Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of Andrology*, 25: 671-678.
- Björndahl L et al. (2005). Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology*, 26: 170-173.
- Bland JM, Altman DG (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1: 307-310.
- Bohring C, Krause W (1999). The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Human Reproduction*, 14: 1802-1805.
- Bonde JP et al. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352: 1172-1177.
- Boomsma CM et al. (2004). Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD004507.

- Bourne H et al. (1995). Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, Fertility, Development*, 7: 177-183.
- Brazil C et al. (2004a). Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25: 635-644.
- Brazil C et al. (2004b). Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25: 645-656.
- Bronson RA et al. (1982). Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*, 9: 61.
- Bronson RA et al. (1984). Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, 42: 171-183.
- Bunge RGT, Sherman JK (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172: 767-768.
- Bunge RG et al. (1954). Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertility and Sterility*, 5: 520-529.
- Burkman LJ et al. (1988). The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertility and Sterility*, 49: 688-697.
- Canale D et al. (1994). Inter- and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and Percoll. *Journal of Endocrinological Investigation*, 17: 729-732.
- Carey RG, Lloyd RC (1995). *Measuring quality improvement in healthcare: a guide to statistical process control applications*. New York, Quality Resources.
- Carlsen E et al. (2004). Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*, 82: 358-366.
- Carreras A et al. (1992). Sperm plasma membrane integrity measurement: a combined method. *Andrologia*, 24: 335-340.
- Castilla JA et al. (2006). Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction*, 21: 847-851.
- Cekan SZ et al. (1995). *Principles of external quality assessment: a laboratory manual*. Geneva, World Health Organization.
- Cembrowski GS, Carey RN (1989). *Laboratory quality management*. Chicago, ASCP Press.
- Chantler E, Abraham-Peskir JV (2004). Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, 36: 87-93.
- Chemes HE, Rawe YV (2003). Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*, 9: 405-428.
- Chiu WW, Chamley LW (2004). Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 82: 529-535.
- Chohan KR et al. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27: 53-59.
- Christensen P et al. (2005). Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63: 992-1003.
- Clarke GN (1999). Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Human Reproduction* 14: 2941-2943.

- Clarke GN et al. (1982). Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In: Bratanov K, ed. Immunology of reproduction. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.
- Clarke GN et al. (1985). Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 7: 118-123.
- Clarke GN et al. (1997). Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. Human Reproduction, 12: 722-726.
- Clarke GN et al. (2003). Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. Reproduction, Fertility, Development, 15: 377-381.
- Clarke GN et al. (2006). Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. Fertility and Sterility, 86: 721-722.
- Coetzee K et al. (1998). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Human Reproduction Update, 4: 73-82.
- Coetzee K et al. (1999a). Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. Andrologia, 31: 163-168.
- Coetzee K et al. (1999b). Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. Fertility and Sterility, 71: 80-84.
- Coetzee K et al. (1999c). Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). Fertility and Sterility, 71: 222-225.
- Cooper TG (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? Human Reproduction, 20: 9-11.
- Cooper TG, Yeung CH (1998). A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. Journal of Andrology, 19: 542-550.
- Cooper TG, Yeung CH (2006). Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. Fertility and Sterility, 85: 220-224.
- Cooper TG et al. (1990a). The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers α -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. International Journal of Andrology, 13: 329-335.
- Cooper TG et al. (1990b). Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α -glucosidase in seminal plasma. International Journal of Andrology, 13: 297-305.
- Cooper TG et al. (1991). Variations in semen parameters from fathers. Human Reproduction, 6: 859-866.
- Cooper TG et al. (1993). Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. Human Reproduction, 8: 1251-1258.
- Cooper TG et al. (1999). Experience with external quality control in spermatology. Human Reproduction, 14: 765-769.
- Cooper TG et al. (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. International Journal of Andrology, 25: 306-311.
- Cooper TG et al. (2004). Cytoplasmic droplets are normal structures of human spermatozoa but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. Human Reproduction, 19: 2283-2288.

- Cooper TG et al. (2005). Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *International Journal of Andrology*, 28: 58-60.
- Cooper TG et al. (2006). Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *Journal of Andrology*, 27: 483-490.
- Cooper TG et al. (2007). Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal of Andrology*, 28: 1-4.
- Cooper TG et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16: 231-245.
- Corea M et al. (2005). The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertility and Sterility*, 83: 920-922.
- Correa-Perez JR et al. (2004). Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertility and Sterility*, 81: 1148-1150.
- Couture M et al. (1976). Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia*, 8: 61-66.
- Cross NL (1995). Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, eds. *Human sperm acrosome reaction*. Paris, John Libbey Eurotext (Colloques INSERM): 277-285.
- Cross NL et al. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, 15: 213-226.
- Dadoune JP et al. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20: 211-217.
- Daudin M et al. (2000). Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74: 1164-1174.
- David G et al. (1975). Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. I. Propositions pour un système de classification. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 4(Suppl. 1): 17-36.
- David G et al. (1980). The success of A.I.D. and semen characteristics: study of 1489 cycles and 192 ejaculates. *International Journal of Andrology*, 3: 613-619.
- Davis RO, Katz DF (1992). Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, 13: 81-86.
- De Jonge C (2000). Commentary: forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory. *Journal of Andrology*, 21: 203-205.
- De Jonge C et al. (2004). Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility*, 82: 57-65.
- de la Taille A et al. (1998). Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8: 370-376.
- Devillard F et al. (2002). Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Human Reproduction*, 17: 1292-1298.
- Donnelly ET et al. (1998). In-vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*, 70: 305-314.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005a). Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology*, 26: 107-114.

- Douglas-Hamilton DH et al. (2005b). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26: 115-122.
- Drobnis EZ et al. (1988). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Developmental Biology*, 130: 311-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1989). Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51: 317-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1992). Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertility and Sterility*, 58: 1046-1055.
- Eggert-Kruse W et al. (1993). The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59: 617-628.
- Eggert-Kruse W et al. (1996). Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Human Reproduction*, 11: 139-146.
- Eliasson R (1971). Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3: 49-64.
- Eliasson R (1975). Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. *Progress in Infertility*, 2nd ed. New York, Little, Brown: 691-713.
- Eliasson R (1981). Analysis of semen. In: Burger H, de Kretser D, eds. *The testis*. New York, Raven Press: 381-399.
- Eliasson R (2003). Basic semen analysis. In: Matson P, ed. *Current topics in andrology*. Perth, Ladybrook Publishing: 35-89.
- Eliasson R et al. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, 2: 1257.
- ESHRE (1998). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, 13: 142-145.
- ESHRE/NAFA (2002). *Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2)*. Oxford, Oxford University Press.
- Evenson DP, Wixon R (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65: 979-991.
- Ezeh UI, Moore HM (2001). Redefining azoospermia and its implications. *Fertility and Sterility*, 75: 213-214.
- Ezeh UI et al. (1998). Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Human Reproduction*, 13: 3061-3065.
- Feldschuh J et al. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertility and Sterility*, 84: 1017.
- Fenichel P et al. (1989). Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87: 699-706.
- Fetic S et al. (2006). Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 27: 294-301.
- Franken DR et al. (1989). The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in-vitro fertilization (IVF) treatment. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 6: 44-50.
- Franken DR et al. (2000). Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17: 374-378.
- Fredricsson B, Björk G (1977). Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertility and Sterility*, 28: 841-845.

- Gandini L et al. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15: 830-839.
- Gao DY et al. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10: 1109-1122.
- Garrett C, Baker HWG (1995). A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, 63: 1306-1317.
- Garrett C et al. (1997). Selectivity of the human sperm–zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, 67: 362-371.
- Garrett C et al. (2003). Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Human Reproduction*, 18: 1643-1649.
- Gilling-Smith C et al. (2005). Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Human Reproduction*, 20: 1433-1438.
- Gilling-Smith C et al. (2006). HIV and reproductive care—a review of current practice. *British Journal of Gynaecology*, 113: 869-878.
- Gomez E et al. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, 17: 276-287.
- Gomez E et al. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21: 81-94.
- Gould JE et al. (1994). Sperm-immunobead binding decreases with in-vitro incubation. *Fertility and Sterility*, 62: 167-171.
- Grimes DA, Lopez LM (2007). “Oligozoospermia,” “azoospermia,” and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertility and Sterility*, 88: 1491-1494.
- Griveau JF, Le Lannou D (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20: 61-69.
- Handelsman DJ et al. (1984). Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *International Journal of Andrology*, 7: 369-382.
- Haugen TB, Grotmol T (1998). pH of human semen. *International Journal of Andrology*, 21: 105-108.
- Heite H-J, Wetterauer W (1979). Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrologia*, 11: 113-122.
- Hellstrom WJG et al. (1989). A comparison of the usefulness of SpermMar and Immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 52: 1027-1031.
- Henkel R et al. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, 81: 965-972.
- Henley N et al. (1994). Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *International Journal of Andrology*, 17: 78-84.
- Holstein AF et al. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1: 107.

- Homyk M et al. (1990). Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertility and Sterility*, 53: 323-330.
- Hossain AM et al. (1998). Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*, 13: 1578-1583.
- Hotchkiss RS (1945). *Fertility in men*. London, William Heineman Medical Books.
- Huggins C et al. (1942). Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *American Journal of Physiology*, 136: 467-473.
- IARC (1982). *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 4): 169-170.
- Insler V et al. (1972). The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10: 223-228.
- Irvine DS et al. (1994). A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Human Reproduction*, 9: 2324-2334.
- Ivic A et al. (2002). Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Human Reproduction*, 17: 143-149.
- Iwamoto T et al. (2006). Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Human Reproduction*, 21: 760-765.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57: 409-416.
- Jaffe TM et al. (1998). Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *Journal of Urology*, 159: 1548-1550.
- Jeyendran RS et al. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.
- Johanisson E et al. (2000). Evaluation of "round cells" in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6: 404-412.
- Johnsen O, Eliasson R (1987). Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 10: 435-440.
- Johnson DE et al. (1996). Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertility and Sterility*, 66: 459-462.
- Jones DM et al. (1986). Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clinical Reproduction and Fertility*, 4: 367-372.
- Jones R et al. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31: 531-537.
- Jørgensen N et al. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16: 1012-1019.
- Jouannet P et al. (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 11: 379-394.
- Kamischke A et al. (2004). Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies. *Journal of Andrology*, 25: 586-592.

- Karvonen MJ, Malm M (1955). Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 7: 305-307.
- Katz DF et al. (1986). Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, 7: 203-210.
- Keel BA (2006). Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility*, 85: 128-134.
- Keel BA, Webster BW (1993). Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 71-96.
- Kraemer M et al. (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction*, 13: 611-619.
- Krause W (1995). Computer-assisted sperm analysis system: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10 (Suppl. 1): 60-66.
- Krausz C et al. (1992). Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes. *Fertility and Sterility*, 57: 1317-1325.
- Kremer J (1965). A simple sperm penetration test. *International Journal of Fertility*, 10: 209-215.
- Kremer J, Jager S (1980). Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigenreactive sites. *International Journal of Andrology*, 3: 143-152.
- Kruger TF et al. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46: 1118-1123.
- Kruger TF et al. (1987). A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, 18: 275-277.
- Kruger TF et al. (1991). Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8: 154-156.
- Kruger TF et al. (1993). The self teaching programme for strict sperm morphology. Bellville, South Africa, MQ Medical.
- Kuster CE et al. (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, 61: 691-703.
- Lacquet FA et al. (1996). Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Archives of Andrology*, 36: 133-138.
- Larsen L et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15: 1562-1567.
- Le Lannou D, Lansac J (1993). Artificial procreation with frozen donor semen: the French experience of CECOS. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 152-169.
- Le Lannou D et al. (1992). Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reproduction*, 7: 1417-1421.
- Lee JD et al. (1996). Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Human Reproduction*, 11: 1942-1946.

- Leibo SP et al. (2002). Cryopreservation of human spermatozoa. In: Vayena E et al., eds. Current practices and controversies in assisted reproduction. Geneva, World Health Organization: 152-165.
- Lentner C (1981). Geigy scientific tables. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basle, Ciba-Geigy: 50.
- Lindsay KS et al. (1995). Classification of azoospermic samples. *Lancet*, 345: 1642.
- Liu DY, Baker HWG (1988). The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 50: 288-293.
- Liu DY, Baker HWG (1992a). Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 71-84.
- Liu DY, Baker HW (1992b). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 58: 465-483.
- Liu DY, Baker HWG (1994). Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm–zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Human Reproduction*, 9: 1694-1700.
- Liu DY, Baker HWG (1996). Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction with the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm–ZP binding. *Fertility and Sterility*, 66: 312-315.
- Liu DY, Baker HWG (2003). Disordered zona pellucida induced acrosome reaction and failure of in-vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 79: 74-80.
- Liu DY, Baker HW (2004). High frequency of defective sperm–zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Human Reproduction*, 19: 228-233.
- Liu DY et al. (1988). A human sperm–zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertility and Sterility*, 50: 782-788.
- Liu DY et al. (1989). A sperm–zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 52: 281-287.
- Liu DY et al. (1990). Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm–oocyte interactions: comparison of sperm–olemma and sperm–zona pellucida binding, and relationship with results of IVF. *Reproduction, Fertility, Development*, 2: 641-650.
- Liu DY et al. (1991a). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *Journal of Andrology*, 12: 231-239.
- Liu DY et al. (1991b). Horse and marmoset sperm bind to the zona pellucida of salt stored human oocytes. *Fertility and Sterility*, 56: 764-767.
- Liu DY et al. (2003). Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, 18: 2382-2389.
- Liu DY et al. (2004). Clinical application of sperm–oocyte interaction tests in in-vitro fertilization—embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertility and Sterility*, 82: 1251-1263.
- MacLeod J, Wang Y (1979). Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertility and Sterility*, 31: 103-116.
- MacMillan RA, Baker HW (1987). Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clinical Reproduction and Fertility*, 5: 203-209.

- Mahadevan M et al. (1981). Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertility and Sterility*, 36: 243-247.
- Mahmoud AM et al. (1997). The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertility and Sterility*, 68: 340-345.
- Martin RH et al. (2003). A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of Reproduction*, 69: 535-539.
- Matson PL (1995). External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Human Reproduction*, 10: 620-625.
- McKinney KA et al. (1996). Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probe. *Archives of Andrology*, 36: 119-125.
- Meinertz H, Bronson R (1988). Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR). *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 18: 120-123.
- Menkveld R, Kruger TF (1990). Basic semen analysis. In: Acosta AA et al., eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*. Baltimore, Williams & Wilkins: 68-84.
- Menkveld R, Kruger TF (1996). Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In: Acosta AA, Kruger TF, eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*, 2nd ed. London, Parthenon Publishing: 89-107.
- Menkveld R et al. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5: 586-592.
- Menkveld R et al. (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 30: 346-352.
- Menkveld R et al. (1997). Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology by manual and computerized methods. *Andrologia*, 29: 1-7.
- Menkveld R et al. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*, 16: 1165-1171.
- Meschede D et al. (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, 16: 362-369.
- Meseguer M et al. (2006). Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertility and Sterility*, 85: 640-645.
- Moghissi KS (1976). Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27: 117-129.
- Moghissi KS et al. (1964). Mechanism of sperm migration. *Fertility and Sterility*, 15: 15-23.
- Möllering H, Gruber W (1966). Determination of citrate with citrate lyase. *Analytical Biochemistry*, 17: 369-376.
- Morshedi M et al. (2003). Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 79 (Suppl. 3): 1625-1632.
- Mortimer D (1994a). *Practical laboratory andrology*. Oxford, Oxford University Press.
- Mortimer D (1994b). Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, 3: 97-111.
- Mortimer D (2004). Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive Biomedicine Online*, 9: 134-151.

- Mortimer D, Menkveld R (2001). Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *Journal of Andrology*, 22: 192-205.
- Mortimer D, Mortimer S (2005). *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Mortimer D et al. (1995). Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 951-959.
- Nahoum CRD, Cardozo D (1980). Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertility and Sterility*, 34: 68-69.
- Neuwinger J et al. (1990). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertility and Sterility*, 54: 308-314.
- Neuwinger J et al. (1991). Hyaluronic acid as a medium for human sperm migration tests. *Human Reproduction*, 6: 396-400.
- Ng FL et al. (1992). Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reproduction*, 7: 261-266.
- Ng KK et al. (2004). Sperm output of older men. *Human Reproduction*, 19: 1811-1815.
- Oehninger S et al. (1993). The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemi-zona assay conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 35: 57-61.
- Oei SG et al. (1995). When is the post-coital test normal? A critical appraisal. *Human Reproduction*, 10: 1711-1714.
- Overstreet JW et al. (1980). In-vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 34: 604-606.
- Paquin R et al. (1984). Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal α 1,4-glucosidase. *Journal of Andrology*, 5: 277-282.
- Pelfrey RJ et al., (1982). Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertility and Sterility*, 38: 112-114.
- Pérez-Sánchez F et al. (1994). Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *International Journal of Andrology*, 17: 115-120.
- Perloff WH, Steinberger E (1963). In-vitro penetration of cervical mucus by spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 14: 231-236.
- Perloff WH et al. (1964). Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technique. *Fertility and Sterility*, 15: 501-504.
- Plaut DA, Westgard JOW (2002). QC external quality assessment. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing: 125-163.
- Poland ML et al. (1985). Variation of semen measures within normal men. *Fertility and Sterility*, 44: 396-400.
- Polge C et al. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 626-627.
- Pound N et al. (2002). Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology and Behavior*, 76: 685-689.
- Punab M et al. (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia*, 35: 271-278.
- Quinn P et al. (1985). Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 44: 493-498.

- Rajah SV et al. (1992). Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertility and Sterility*, 57: 1300-1303.
- Rao B et al. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, 24: 127-134.
- Rhemrev J et al. (1989). Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, 51: 685-690.
- Rose NR et al. (1976). Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clinical and Experimental Immunology*, 23: 175-199.
- Rossi AG, Aitken RJ (1997). Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 424: 245-252.
- Said TM et al. (2004). Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertility and Sterility*, 82: 871-877.
- Sakkas D et al. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 13(Suppl. 4): 11-19.
- Savasi V et al. (2007). Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Human Reproduction*, 22: 772-777.
- Sawyer DE et al. (2003). Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research*, 529: 21-34.
- Scarselli G et al. (1987). Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Europea Fertilitatis*, 18: 55-57.
- Schmidt KL et al. (2004). Assisted reproduction in male cancer survivors: fertility treatment and outcome in 67 couples. *Human Reproduction*, 19: 2806-2810.
- Seaman EK et al. (1996). Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertility and Sterility*, 66: 662-665.
- Shah VP et al. (2000). Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharmacological Research*, 17: 1551-1557.
- Sharif K (2000). Reclassification of azoospermia: the time has come? *Human Reproduction*, 15: 237-238.
- Sharma RK et al. (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*, 22: 575-583.
- Sherman JK (1990). Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, eds. *CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, CRC Press: 229-259.
- Shibahara H et al. (2004). Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology*, 27: 63-68.
- Slama R et al. (2002). Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 17: 503-515.
- Smith R et al. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction*, 11: 1655-1660.
- Sobrero AJ, MacLeod J (1962). The immediate postcoital test. *Fertility and Sterility*, 13: 184-189.

- Soler C et al. (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *International Journal of Andrology*, 23: 77-84.
- Tedder RS (1995). Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346: 137-140.
- Tomlinson M (2005). Managing risk associated with cryopreservation. *Human Reproduction*, 20: 1751-1756.
- Tomlinson MJ et al. (1993). Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, 60: 1069-1075.
- Toner JP et al. (1995). Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia*, 27: 143-148.
- Tyler JP et al. (1982a). Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1: 273-285.
- Tyler JP et al. (1982b). Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1: 287-293.
- Van der Merwe FH et al. (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 59: 86-91.
- Van Waart J et al. (2001). Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction Update*, 7: 495-500.
- Verheyen G et al. (1993). Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Human Reproduction*, 8: 1678-1684.
- Virro MR et al. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 81: 1289-1295.
- von der Kammer H et al. (1991). The evaluation of markers of prostatic function. *Urological Research*, 19: 343-347.
- von Eckardstein S et al. (2000). Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 73: 1226-1231.
- Watson PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891.
- Weiske WH (1994). Minimal invasive Vasektomie mittels Fulgurationstechnik. Erfahrungen bei 1000 Patienten in 12 Jahren. *Urologe*, B34: 448-452.
- Weiske WH et al. (2000). Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia*, 32: 13-18.
- Westgard JO (2002). Foreword to the second edition. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing.
- Wheeler DJ (1993). *Understanding variation: the key to managing chaos*. Knoxville, TN, SPC Press.
- Wheeler DJ, Chambers DS (1992). *Understanding statistical process control*, 2nd ed. Knoxville, TN, SPC Press.
- WHO (1986). Consultation on the zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male fertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 6).

- WHO (1987). (prepared by Comhaire F et al.) Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 7): 22-24.
- WHO (1996). Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility*, 65: 821-829.
- WHO (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- WHO (2004). Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).
- Wilton LJ et al. (1988). Human male infertility caused by degeneration and death of sperms in the epididymis. *Fertility and Sterility*, 49: 1051-1058.
- Wolf DP (1995). Semen cryopreservation. In: Keye WR et al., eds. *Infertility evaluation and treatment*. Philadelphia, WB Saunders: 686-695.
- Wolff H (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 63: 1143-1157.
- Woods EJ et al. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48: 146-156.
- Yanagimachi R et al. (1979). Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 31: 562-574.
- Zavos PM, Goodpasture JC (1989). Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertility and Sterility*, 51: 190-193.
- Zinaman MJ et al. (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 17: 288-292.
- Zinaman MJ et al. (2000). Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, 21: 145-153.
- Zorn B et al. (2003). Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology*, 26: 279-285.

Apêndices

APÊNDICE 1 Valores de referência e nomenclatura do sêmen

A1.1 Valores de referência

As medições feitas em amostras de sêmen precisam ser comparadas com valores de referência para permitir que as decisões sejam tomadas baseadas nos casos individuais dos pacientes e dentro dos limites para os ensaios clínicos ou investigações. Os valores de referência apresentados aqui foram gerados a partir dos resultados de vários estudos prospectivos transversais de qualidade de sêmen e fertilidade. Eles foram obtidos por seleção direta e retrospectiva de homens férteis, definidos como homens cuja parceira concebeu dentro dos 12 meses após o término do uso da contracepção (Cooper et al., 2010).

- Foram incluídas nesta análise apenas amostras completas de sêmen, uma por homem (a primeira de várias dadas), obtidas após 2 a 7 dias de abstinência.
- O volume de sêmen foi medido usando métodos recomendados pela OMS na época, ou seja, pesagem ou transferência para pipetas ou recipientes graduados. O número total de espermatozoides foi calculado a partir das concentrações medidas por hemocitômetro em amostras fixas diluídas. A motilidade total (PR + NP), a motilidade progressiva (PR), a motilidade não progressiva (NP) e o espermatozoide imóvel (IM) foram medidos à temperatura ambiente ou a 37 °C. Os dados sobre a morfologia espermática normal foram obtidos apenas em laboratórios que forneceram valores que não excedem o nível máximo previsto para o método de categorização rigorosa (Tygerberg) (aproximadamente 35% das formas normais). A vitalidade foi determinada pela exclusão de corante vital (eosina) das membranas da cabeça do espermatozoide.
- A tradição estatística é considerar o percentil 2,5 de um intervalo de referência bilateral como o limite baixo no qual os valores podem ser considerados provenientes de uma população diferente. No entanto, um intervalo de referência unilateral foi considerado mais apropriado para parâmetros de sêmen, uma vez que valores altos não são prejudiciais à fertilidade. Os 5º percentis dos limites de referência mais baixos são dados na Tabela A1.1 e as distribuições de frequência completas são dadas na Tabela A1.2.

Comentário 1: As distribuições de referência na Tabela A1.2 fornecem uma descrição das características do sêmen de pais recentes, cuja parceira ficou grávida dentro de 12 meses após o término do uso da contracepção.

Comentário 2: Os pais constituem um grupo seletivo de indivíduos e seus parâmetros de sêmen podem ser diferentes daqueles da população geral de homens saudáveis.

Comentário 3: As características do sêmen são altamente variáveis, tanto dentro quanto entre os homens, e não são os únicos determinantes da fertilidade de um casal; os intervalos, portanto, fornecem apenas um guia para o status de fertilidade de um homem.

Comentário 4: Os parâmetros de sêmen que estão dentro do intervalo de referência de 95% não garantem a fertilidade.

Comentário 5: Homens cujas características de sêmen estão abaixo dos limites inferiores dados aqui não são necessariamente inférteis; suas características de sêmen estão abaixo do intervalo de referência de pais recentes -como são, por definição, aqueles de 5% dos homens férteis que forneceram dados usados no cálculo da faixa de referência.

Comentário 6: As características do sêmen de um homem precisam ser interpretadas em conjunto com informações clínicas.

Comentário 7: Pode haver diferenças regionais na qualidade do sêmen e diferenças entre laboratórios; laboratórios devem considerar a preparação de suas próprias faixas de referência, utilizando as técnicas descritas neste manual.

Comentário 8: O tempo de gravidez também é afetado pelo status de fertilidade da parceira.

Tabela A1.1 Limites de referência mais baixos (5º percentis e seus intervalos de confiança de 95%) para as características do sêmen

Parâmetro	Limite inferior de referência
Volume do sêmen (ml)	1,5 (1,4–1,7)
Número total de espermatozoides (10^6 por ejaculado)	39 (33–46)
Concentração de espermatozoides (10^6 per ml)	15 (12–16)
Motilidade total (PR + NP, %)	40 (38–42)
Motilidade progressiva (PR, %):	32 (31–34)
Vitalidade (espermatozoides vivos, %)	58 (55–63)
Morfologia espermática (formas normais, %)	4 (3,0–4,0)
Outros valores limites de consenso	
pH	$\geq 7,2$
Leucócitos positivos para peroxidase (10^6 por ml)	$< 1,0$
Teste MAR (espermatozoides móveis com partículas ligadas, %)	< 50
Teste de imunoglobulina (espermatozoides móveis com esferas aderidas, %)	< 50
Zinco seminal (μmol /ejaculado)	$\geq 2,4$
Frutose seminal (μmol /ejaculado)	≥ 13
Glucosidase seminal neutra (mU/ejaculado)	≥ 20

Tabela A1.2 Distribuição de valores dos parâmetros do sêmen de homens cujas parceiras engravidaram no prazo de 12 meses após a interrupção do uso de contraceptivos

Parâmetro (unidades)	N	Percentis								
		2,5	5	10	25	50	75	90	95	97,5
Volume do sêmen (ml)	194 1	1,2	1,5	2,0	2,7	3,7	4,8	6,0	6,8	7,6
Número total de espermatozoides (10^6 por ejaculado)	185 9	23	39	69	142	255	422	647	802	928
Concentração do espermatozoide (10^6 por ml)	185 9	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Motilidade total (PR + NP, %)	178 1	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Motilidade progressiva (PR, %)	178 0	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Motilidade não progressiva (NP, %)	177 8	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Espermatozoides imóveis (IM, %)	186 3	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Vitalidade (%)	428	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Formas normais (%)	185 1	3	4	5,5	9	15	24,5	36	44	48

Fonte: Cooper et al., 2010.

A1.2 Nomenclatura

Este manual mantém a nomenclatura introduzida para descrever os desvios dos valores de referência de sêmen, usando palavras em vez de números (ver Tabela A1.3), embora alguns tenham argumentado em favor do abandono dessa terminologia (Grimes & Lopez, 2007). A nomenclatura simplesmente classifica a qualidade do sêmen e não sugere nenhuma causa biológica (Eliasson et al., 1970). Esses termos são usados para descrever amostras com valores fora do intervalo de referência e, portanto, possivelmente provenientes de uma população diferente. Grande parte da nomenclatura do sêmen refere-se a um único parâmetro. No entanto, normozoospermia refere-se a três parâmetros espermáticos - número, motilidade e morfologia. Assim, os desvios do intervalo de referência para cada parâmetro podem ser descritos individualmente.

Referências

- Cooper TG et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16: 231-245.
- Grimes DA, Lopez LM (2007). "Oligozoospermia", "azoospermia", and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertility and Sterility*, 88: 1491-1494.
- Eliasson R et al. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, 2: 1257.

Tabela A1.3 Nomenclatura relacionada à qualidade do sêmen

Aspermia	Sem sêmen (sem ou ejaculação retrógrada)
Astenozoospermia	Percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (PR) abaixo do limite inferior de referência
Asteneratozoospermia	Percentagens de espermatozoides progressivamente móveis (PR) e morfológicamente normais abaixo dos limites de referência mais baixos
Azoospermia	Sem espermatozoides no ejaculado (dado como limite de quantificação para o método de avaliação empregado)
Criptozoospermia	Espermatozoides ausentes nas preparações frescas, mas observados no sedimento centrifugado
Hemospermia (hematospermia)	Presença de eritrócitos no ejaculado
Leucospermia (leucocitospermia, piospermia)	Presença de leucócitos acima do valor limite no ejaculado
Necrozoospermia	Baixa percentagem de espermatozoides vivos e alta percentagem de espermatozoides imóveis no ejaculado
Normozoospermia	Número total (ou concentração, dependendo do desfecho relatado)* de espermatozoides e percentual de espermatozoides progressivamente móveis (PR) e morfológicamente normais, igual ou acima dos limites de referência mais baixos
Oligoastenozoospermia	Número total (ou concentração, dependendo do desfecho relatado)* de espermatozoides e percentual de espermatozoides progressivamente móveis (PR), abaixo dos limites de referência mais baixos
Oligoasteneratozoospermia	Número total (ou concentração, dependendo do desfecho relatado)* de espermatozoides e percentual de ambos espermatozoides progressivamente móveis (PR) e morfológicamente normais, abaixo dos limites de referência mais baixos
Oligoteratozoospermia	Número total (ou concentração, dependendo do desfecho relatado)* de espermatozoides e percentual de espermatozoides morfológicamente normais, abaixo dos limites de referência mais baixos
Oligozoospermia	Número total (ou concentração, dependendo do desfecho relatado)* de espermatozoides abaixo dos limites de referência mais baixos
Teratozoospermia	Percentagens de espermatozoides morfológicamente normais abaixo dos limites de referência mais baixos

*Sempre deve ser dada preferência ao número total, pois esse parâmetro tem precedência sobre a concentração.

Nota: O sufixo “spermia” refere-se ao ejaculado e “zoospermia” aos espermatozoides. Assim, os seguintes termos não devem ser utilizados: astenospermia, asteneratospermia, criptospermia, oligoastenospermia, oligoteratospermia, oligospermia, teratospermia.

APÊNDICE 2 Equipamento e segurança

A2.1 Suprimentos básicos necessários em um laboratório de andrologia

Abaixo está uma lista dos suprimentos e equipamentos necessários em um laboratório de andrologia para realizar os testes básicos descritos neste manual.

Consulte a literatura científica publicada, mencionada neste manual ou em outro lugar, se precisar de assistência para encontrar uma fonte de qualquer um dos seguintes suprimentos.

A2.1.1 O laboratório deve ter os seguintes equipamentos e suprimentos gerais:

- Balança;
- Bancadas com superfície de trabalho impermeável;
- Recipientes:
 - Para eliminação de objetos pontiagudos;
 - Para resíduos perigosos;
- Cópia do manual de biossegurança de laboratório (OMS, 2004);
- Freezer horizontal;
- Desinfetante ou hipoclorito de sódio, 0,1% (v/v) e 1% (v/v) em água purificada;
- Sabonete desinfetante ou limpador de pele antisséptico;
- Luvas descartáveis;
- Solução para lavagem ou enxague de olhos;
- Kit de primeiros socorros;
- Capela de exaustão para armazenamento de, e para trabalhar com reagentes tóxicos, produtos químicos ou corantes;
- Refrigerador;
- Chuveiro.

A2.1.2 Os seguintes suprimentos e equipamentos são necessários para a análise de sêmen:

- Tubos capilares e selante (para teste de penetração de muco);
- Máquina CASA (opcional);
- Centrífugas:
 - Centrífuga de mesa capaz de atingir 300-500g (para manipulação de rotina de espermatozoides e urina), 1000g (para marcadores de sêmen) e 2000g (para amostras viscosas);
 - Centrífuga de alta velocidade atingindo 3000g (para a preparação de amostras suspeitas de azoospermia) ou microcentrífuga, atingindo 16.000g (para obtenção de plasma seminal sem espermatozoides) (ver Quadro A2.1);
- Equipamento de criopreservação (opcional);
- Preservativos: sem espermicida, não tóxicos (opcional);
- Frascos de diluição;
- Microscópio de dissecação (opcional; para a coleta de oócitos de hamster);
- Papel de filtro, 90 g/m² (para filtrar corantes);
- Microscópio de fluorescência e objetivos (opcional; para medições de concentração espermática de alta sensibilidade e testes de reação acrossômica);
- Hemocítômetros: Neubauer melhorada ou alternativa, 100 µm de profundidade, com lamela espessa (espessura N° 4, 0,44 mm);

- Incubadora (37 °C), preferencialmente com 5% (v/v) CO₂ (opcional);
- Filme de laboratório: autosselante, moldável;
- Contador multiteclas de laboratório (seis ou nove teclas);
- Câmara de contagem de grandes volumes (opcional; para avaliar baixas concentrações de espermatozoides);
- Luminômetro (opcional; para teste de ROS);
- Lâminas de microscópio:
 - Com vidro plano ou superfície de escrita texturizada e lamínulas (espessura número 1,5, 0,16–0,19 mm);
 - Lâminas planas, para puxar uma gota de sêmen sobre outra lâmina, para fazer esfregaços de sêmen;
- Canetas/lápis:
 - Para escrever em lâminas de vidro fosco; um lápis com mina de suavidade HB (número de classificação americana 2) é adequado;
 - Um lápis de cera/graxa (caneta delimitadora - opcional; para limitar a área de solução de anticorpos em uma lâmina);
 - Caneta permanente;
- Eletrodo de pH (ISFET) (opcional; para amostras de sêmen viscoso);
- Papel de pH (intervalo de 6 a 10);
- Microscópio de contraste de fase (para estimativa da concentração de espermatozoides, motilidade, morfologia) com, pelo menos, uma fonte de luz de 50 watts e os seguintes acessórios (ver Apêndice 3):
 - Objetivos de fase positiva × 10, × 20 (ou × 25), × 40 (ou × 63), objetivo de imersão em óleo × 100;
 - Objetivo de fase negativa × 40 (opcional; para teste de vitalidade com eosina);
 - Ocular de campo largo × 10 (ou × 12,5);
 - Retícula para ocular (para julgar a área de campo revisada quanto à motilidade);
 - Micrômetro de platina (para medição de morfologia espermática);
 - England finder (lâmina em vidro com grade - opcional; para avaliação de QC);
 - Platina aquecedora (opcional; para medição da velocidade dos espermatozoides);
- Pipetas e ponteiros de pipeta:
 - Pipetas de Pasteur com conta-gotas de látex, ou pipetas de transferência de plástico descartáveis, ou pipetas automáticas para misturar sêmen;
 - Pipetas de deslocamento de ar;
 - Pipetas de deslocamento positivo de 10–100 µl;
- Formulários de registro para resultados de análise de sêmen e muco (consulte o Apêndice 6);
- Misturadores de amostra:
 - Agitador bidimensional ou roda giratória para misturar sêmen (opcional);
 - Agitador vórtex para sêmen diluído;
- Fita de vedação para placas de 96 poços (opcional; para teste de frutose);
- Recipiente de coleta de sêmen:
 - Recipientes descartáveis de boca larga com tampa;
 - Cilindros de vidro para coleta autoclaváveis;
- Câmaras para lâminas, descartáveis (opcional; para preparação de amostras de motilidade para QC);
- Espectrofotômetro (opcional; para ensaios bioquímicos de sêmen);
- Placa de toque, de porcelana ou vidro borossilicato (para teste de eosina-nigrosina);
- Gerador de tempo (opcional; para preparação de amostras para QC);

- Lenço de papel: sem fiapos;
- Placa de aquecimento: para mesa de trabalho (opcional; para pré-aquecimento de lâminas para avaliação de mobilidade).

A2.1.3 Os seguintes produtos químicos podem ser necessários:

- Anticorpos (CD45 para leucócitos);
- Agente antiespumante (opcional; para preparação de amostras de QC);
- Kit de peroxidase celular (opcional);
- Meios crioprotetores (opcional);
- Meios de gradiente de densidade (para preparação de espermatozoides);
- Kit de análise de frutose (opcional);
- Glutaraldeído (opcional; para o teste de HOP);
- Óleo mineral (opcional; para o teste de HOP);
- Kit de teste de α -glucosidase neutra (opcional);
- Coloração de Papanicolaou;
- Vaselina (opcional; para teste de HOP);
- Kit de coloração rápida (opcional; para morfologia espermática);
- Cera (ponto de fusão 48-66 °C) (opcional; para o teste de HOP);
- Kit de análise de zinco (opcional).

Quadro A2.1 Calculando forças centrífugas

A força à qual os espermatozoides são submetidos durante a centrifugação (força centrífuga relativa, RCF) depende da velocidade de rotação (N, rotações por minuto, r.p.m.) e da distância do centro do rotor até o ponto em que a força deve ser medida (geralmente a parte inferior do tubo da centrífuga) (raio, R, cm). A RCF é calculada a partir da fórmula: $1,118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$. Por exemplo, com um raio de rotor de 8,6 cm, centrifugação a 5000 r.p.m. irá produzir uma força de 2404g; com um raio de rotor de 13,5 cm, centrifugação a 3900 r.p.m. vai produzir 2296g. A Fig. A2.1 é um Nomograma para determinar a RCF do raio do rotor e a velocidade de rotação.

A2.2 Potenciais riscos biológicos em um laboratório de andrologia

Os fluidos do corpo humano, como o sêmen, são potencialmente infecciosos e devem ser manipulados e descartados com cuidado especial. Para o laboratório de andrologia, os microrganismos infecciosos mais importantes que podem ser encontrados no sêmen são os vírus HIV e hepatites B e C (HBV e HCV). O pessoal do laboratório deve tratar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas e deve usar a cautela apropriada ao lidar com elas.

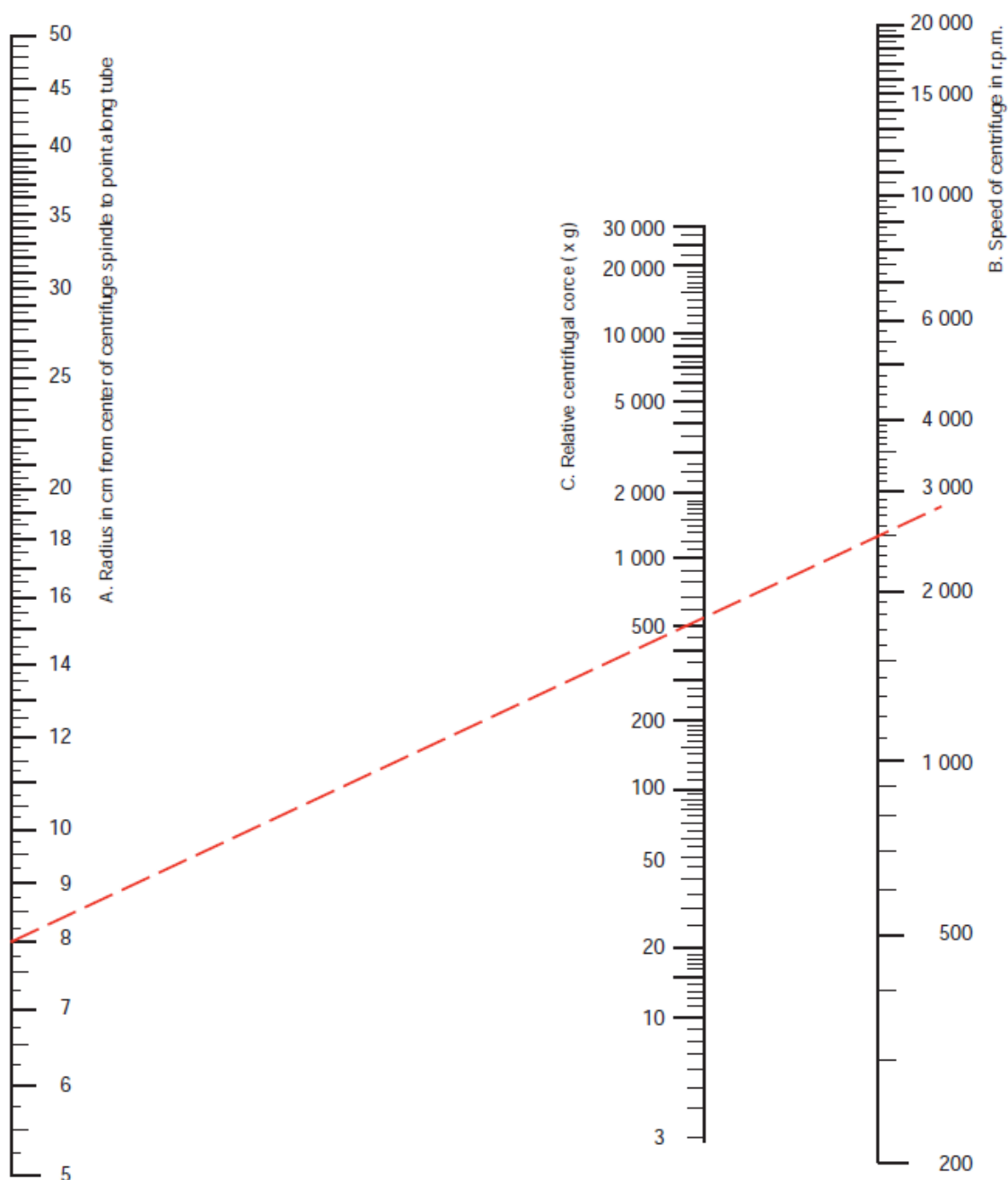
A2.3 Procedimentos de segurança para pessoal de laboratório

- Todo pessoal de laboratório que trabalha com amostras humanas deve ser imunizado contra hepatite B.
- Ninguém deve comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou armazenar alimentos no laboratório de andrologia.
- A pipetagem por via oral não deve ser permitida. Os dispositivos mecânicos de pipetagem devem ser usados sempre para a manipulação de líquidos.

- Todo o pessoal do laboratório deve usar um jaleco ou um avental descartável no laboratório e removê-lo ao sair. O pessoal de laboratório deve usar luvas descartáveis (borracha, látex ou vinil, com ou sem pó), especialmente ao manusear sêmen fresco, ou congelado, ou plasma seminal ou outras amostras biológicas e quaisquer recipientes que tenham entrado em contato com eles. As luvas devem ser removidas e descartadas quando o pessoal sair do laboratório ou ao usar o telefone ou o computador. Elas não devem ser reutilizadas.
- O pessoal deve lavar as mãos regularmente, especialmente antes de sair do laboratório, depois de manusear os espécimes e depois de retirar as roupas e luvas.
- A equipe deve tomar precauções para evitar ferimentos acidentais com instrumentos cortantes que possam estar contaminados com sêmen e evitar o contato do sêmen com a pele aberta, cortes, abrasões ou lesões.

Fig. A2.1 Nomograma para determinar a força centrífuga relativa (RCF) a partir do raio do rotor e a velocidade de rotação

Uma linha reta unindo o raio do rotor (cm, eixo esquerdo) e a velocidade de rotação (r.p.m., eixo direito) cruza o eixo do meio na RCF. No exemplo, um raio de 8 cm com uma velocidade de rotação de 2500 r.p.m. dá uma RCF de aproximadamente 550g. (O valor calculado é 559g (ver Quadro A2.1)).



A. Radius in cm from center of centrifuge spindle to point along tube	A. Raio em centímetros do centro do eixo da centrífuga a um ponto ao longo do tubo
C. Relative centrifugal force (x g)	C. Força centrífuga relativa (x g)
B. Speed of centrifuge in r.p.m.	B. Velocidade da centrífuga em r.p.m.

- Devem ser tomadas medidas para prevenir e, quando necessário, conter derrames de sêmen ou amostras de sangue ou urina.
- Todos os objetos pontiagudos (agulhas, lâminas, etc.) devem ser colocados, após o uso, em um recipiente marcado. Este recipiente deve ser selado antes de ficar cheio e descartado da mesma forma que outros itens de laboratório perigosos.
- Todos os itens potencialmente perigosos (luvas, recipientes de sêmen) devem ser coletados e descartados apropriadamente.

- Máscaras faciais ou máscaras cirúrgicas devem ser usadas por todos os funcionários que realizem procedimentos que possam potencialmente criar aerossóis ou gotículas, por ex. agitação e centrifugação de recipientes abertos. As últimas gotas de amostras de sêmen não devem ser expelidas à força das pipetas, pois isso pode causar a formação de gotículas ou aerossóis.
- A equipe deve usar óculos de proteção, luvas de isolamento e sapatos fechados quando necessário, por exemplo, ao usar nitrogênio líquido (ver Seção A2.5).

A2.4 Procedimentos de segurança para equipamentos de laboratório

Superfícies de trabalho e vasos não descartáveis que entrem em contato com sêmen ou outras amostras biológicas devem ser esterilizados ou desinfetados. Os procedimentos a seguir devem ser executados:

Diariamente, ao completar as análises:

- Lavar o espaço de trabalho com desinfetante, por ex. hipoclorito de sódio a 0,1% (1 g/l) ou desinfetante similar, esperar pelo menos 1 hora (ou durante a noite) e enxaguar o desinfetante com água.
- Mergulhar as câmaras de contagem e as lamínulas em hipoclorito de sódio a 0,1% (1 g/l) ou desinfetante similar durante a noite. Enxaguar o desinfetante com água.

Depois de um derramamento:

- Se o exterior de um recipiente de amostras for contaminado, lavar com desinfetante, por ex. hipoclorito de sódio a 0,1% (1 g/l) ou desinfetante similar, em seguida, enxaguar com água.
- Imediatamente após qualquer derramamento, lavar a bancada com desinfetante, por ex. hipoclorito de sódio a 1,0% (10 g/l) ou desinfetante similar, esperar pelo menos 4 horas, depois enxaguar o desinfetante com água.

Quando for necessário, a inativação por calor do HIV em frascos de coleta de sêmen pode ser conseguido por:

- Esterilização por calor seco por pelo menos 2 horas a 170 °C (340 °F). Cobrir com papel alumínio antes de aquecer e deixar esfriar antes de manusear.
- Esterilização a vapor (autoclavagem) por pelo menos 20 minutos a 121 °C (250 °F) a 101 kPa (15 psi ou 1 atmosfera) acima da pressão atmosférica.
- Ebulição contínua por 20 a 30 minutos.

A2.5 Precauções de segurança ao manusear nitrogênio líquido

- O nitrogênio líquido é perigoso. Sempre o manuseie com cuidado, use apenas tanques aprovados e não tente vedar os contêineres. Use pinças para retirar objetos imersos em nitrogênio líquido.
- Proteja os olhos com um protetor facial ou óculos de segurança. Proteja as mãos com couro seco solto ou luvas isoladas. Proteja os pés com sapatos fechados.

- Quando o nitrogênio líquido é derramado em uma superfície, ele tende a cobri-la completamente e, portanto, esfria uma grande área. Objetos que são macios e flexíveis à temperatura ambiente geralmente tornam-se duros e frágeis à temperatura do nitrogênio líquido.
- A temperatura extremamente baixa pode causar ferimentos graves. Derramá-lo na pele pode produzir um efeito semelhante a uma queimadura. O gás que sai do líquido é extremamente frio. Tecidos delicados, como os dos olhos, podem ser danificados até mesmo por uma breve exposição ao gás, que pode não afetar a pele do rosto ou das mãos.
- Evite ferver e salpicar nitrogênio líquido e seu gás frio. Ebulição e respingos sempre ocorrem quando um recipiente aquecido é carregado ou quando objetos aquecidos são inseridos no líquido. Sempre execute estas operações lentamente para minimizar a ebulição e respingos.
- Evite tocar tubos não isolados. Nunca permita que qualquer parte desprotegida do corpo toque em tubos ou recipientes contendo nitrogênio líquido. O metal extremamente frio pode ficar grudado e a carne será rasgada quando forem feitas tentativas de soltá-lo.
- Trabalhe em áreas bem ventiladas. Uma pequena quantidade de nitrogênio líquido forma uma grande quantidade de gás (à temperatura ambiente é nove vezes o volume do líquido). Se o gás nitrogênio evaporar do líquido em uma sala fechada, a porcentagem de oxigênio no ar pode ficar baixa e criar um risco de asfixia. Os detectores de oxigênio, que disparam um alarme quando o nível de oxigênio cai abaixo de 17% (v/v), estão disponíveis e devem ser usados quando o nitrogênio líquido é armazenado.
- Use apenas tubos e varinhas especialmente feitos para congelamento em nitrogênio líquido. Deve-se tomar cuidado, pois mesmo estes podem explodir quando se aquecem.

Referência

WHO (2004). Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).

APÊNDICE 3 Microscopia

A melhor fonte de informação para um determinado microscópio é o manual do fabricante, que deve incluir um diagrama identificando todas as partes. Se tal manual não estiver disponível, pode ser possível obter informações sobre a configuração e uso do microscópio a partir de uma pesquisa na Internet.

Para as avaliações de sêmen descritas neste manual, recomenda-se um microscópio de contraste de fase. O microscópio, com pelo menos uma fonte de luz de 50 watts, deve preferencialmente ser binocular (ter duas oculares), com um condensador de fase, e deve ser equipado com objetivos de fase $\times 10$, $\times 20$ (ou $\times 25$) e $\times 40$ (ou $\times 63$) (para avaliação geral, motilidade, vitalidade e contagem de espermatozoides e células não espermáticas) e um objetivo de campo claro de imersão em óleo $\times 100$ (para avaliação da morfologia e vitalidade). Uma lente de fase negativa pode ser necessária para medições de vitalidade, e alguns equipamentos CASA, e uma lente de fluorescência é necessária para a microscopia de fluorescência.

- A qualidade e o preço das lentes objetivas variam consideravelmente (ver Quadro A3.1). Os objetivos mais caros oferecem uma imagem melhor, mas objetivos de menor qualidade podem ser adequados.
- Retículas oculares (retículas, gráticas, micrômetros oculares) são discos de vidro com escalas de dimensões conhecidas, geralmente de 5 mm ou 10 mm, ou grades de várias formas, inscritas nelas. Algumas oculares têm retículos montados permanentemente; outras podem ser desatarraxadas para permitir a inserção de outro retículo. Eles estão disponíveis em diferentes diâmetros e devem corresponder exatamente ao diâmetro da ocular. Eles podem ser calibrados com um micrômetro de platina para determinar as dimensões dos espermatozoides. Eles também são usados para limitar a área do campo avaliada quanto à motilidade espermática. O mostrado na Fig. 2.4 (a) e na Fig. A7.4 (a) é uma grade de 5 mm \times 5 mm, que é um bom tamanho para avaliação de motilidade em ambas ampliações $\times 20$ e $\times 40$. Alguns técnicos preferem isso a uma grade de 10 mm \times 10 mm para estimar a concentração ou a morfologia.
- Um micrômetro de platina é uma lâmina de microscópio modificada com uma escala gravada em sua superfície, geralmente de 1 mm, dividida em subdivisões de 10 μ m. Pode ser utilizado para calibrar o micrômetro ou a retícula da ocular e para medir dimensões, por ex. para análises de motilidade (ver Fig. A7.5).

O procedimento descrito abaixo garantirá a melhor imagem possível do microscópio. Se a direção da luz estiver adequadamente alinhada e ajustada, a imagem ficará clara, nítida e provavelmente não causará cansaço visual. Os procedimentos a seguir precisam ser executados ao usar um novo microscópio ou sempre que as imagens forem de baixa qualidade.

A3.1 Montando a amostra

- Colocar 10 μ l de sêmen (ou outro volume, ver Quadro 2.4) numa lâmina de microscópio, cobrir com uma lamela de 22 mm \times 22 mm (espessura 1,5, 0,17 mm) (ou outra dimensão, ver Quadro 2.4) e colocar a lâmina na platina. Você também pode usar um micrômetro de platina em vez de uma lâmina de sêmen, para ajustar o microscópio.

- Acender a luz e ajustá-la para a intensidade que dá o máximo de contraste enquanto seja confortável para os seus olhos.
- Selecionar a lente objetiva de fase positiva $\times 10$. Girar a roda do condensador para corresponder ao poder da lente objetiva escolhida.

Nota: Se o microscópio for trinocular (isto é, tem uma terceira ocular à qual uma câmara pode ser anexada para fotografia ou gravação de vídeo), haverá um botão de deflexão de luz, que geralmente está localizado à direita das oculares. Esse botão provavelmente tem três configurações: uma para permitir que toda a luz seja direcionada para as oculares, uma para permitir que toda a luz entre na câmara e uma terceira que desvia metade da luz para as oculares e metade para a câmara.

Quadro A3.1 Lente objetiva

Cada lente do microscópio contém informações, como:

UPlanFI		PlanApo	Plan Neofluor	Plan	S Fluor
20 \times /0.80	imm	40 \times /0.75 Ph2	100 \times /1.35 oil	100 \times /1.25	oil 20 \times /0.75
corr			iris	Ph3	
160/0.17		∞ /0.17	∞ / —	∞ /0.17	WD 1.0

As explicações das várias marcações são dadas abaixo.

Plan: uma lente plana, permitindo um campo de visão plano, no qual tudo está em foco.

Apo: uma lente apocromática que é altamente corrigida por aberração cromática.

F, FI, FL, Neofluor, Fluo, Fluotar, UV, S-Fluor: uma lente que irá transmitir luz UV e é usada para microscopia de fluorescência.

100 \times , $\times 63$, 40 \times , etc.: a ampliação da lente.

0.30, 0.50, 0.80, 1.30, 1.40, etc.: a abertura numérica da lente (NA). Esta é uma indicação da capacidade de captação de luz da lente. Juntamente com o comprimento de onda da luz usada (λ , lambda), a NA determina a resolução (a menor distância entre dois objetos que podem ser distinguidos como separados). $NA = \eta \times \sin \alpha$, onde η (eta) é o índice de refração do meio de imersão e α (alfa) é o ângulo entre a borda do cone de iluminação e a vertical. Como o valor máximo de $\sin \alpha$ é 1,00, a NA máxima é teoricamente igual a η , mas na prática o valor máximo é 1,4. Escolha a maior NA para melhor resolução.

Ph, Ph1, Ph2, Ph3, NP, N: indica uma lente com um anel de fase. Ph indica anéis de fase positiva e NP ou N fase negativa. Cada uma das lentes Ph1, Ph2 e Ph3 requer um anel de fase diferente no condensador. A óptica de contraste de fase positiva permite a visualização de estruturas intracelulares (usadas para preparações úmidas e motilidade), enquanto a óptica de contraste de fase negativa produz imagens brancas contra um fundo escuro (usado para vitalidade em preparação úmida ou CASA).

Imm, immersion, oil, W: indica uma lente projetada para trabalhar com um fluido - geralmente óleo, água (W) ou glicerol - entre o objeto e a lente para fornecer uma imagem mais nítida. (Se não for indicado, a lente está "seca" e não deve ser usada com líquido).

Iris: indica uma lente com uma íris controlada por um anel estriado.

Corr: indica uma lente com um anel de correção estriado que permite o uso de meios de imersão de diferentes índices de refração.

160, ∞ : o comprimento do tubo ou a distância entre a ocular e a objetiva. Geralmente é de 160 mm, mas em lentes modernas pode ser infinito (∞).

0.17, —: a espessura da lamela exigida para a objetiva. O número de lamínula 1,5 (espessura 0,16-0,19 mm) é útil para a maioria dos propósitos. Hemocítomos precisam de lamínulas número 4 (espessura 0,44 mm). "-" significa que a espessura da lamela não é importante ou que o fluido de imersão pode ser adicionado diretamente à lâmina.

WD: distância de trabalho; a distância do elemento da lente frontal da objetiva à superfície mais próxima da lamela quando a amostra está em foco nítido. A WD geralmente diminui à medida que a ampliação e o NA aumentam, dando origem a lentes com distâncias de trabalho normais (NWD, até 5 mm), longas (LWD, 5,25–9,75 mm), extra longas (ELWD, 10–14 mm) e super longas (SLWD, 15-30 mm). Alguns microscópios podem requerer uma lente LWD para uso com uma câmara Neubauer aprimorada.

Índice de refração: a extensão do retardamento de fase da luz que passa através de um meio. O índice de refração (RI, η , eta) do vácuo é 1,0000, do ar é aproximadamente 1,0 (1,0008), da água é 1,33, do glicerol é 1,47 e da maioria dos óleos de imersão é 1,515. Os

suportes de montagem após a secagem têm índices de refração semelhantes (1,488–1,55) aos do vidro (1,50–1,58).

A3.2 Ajustando as oculares

Ajustar o espaço entre as oculares para os seus próprios olhos, separando as oculares ou juntando-as.

A3.3 Focando a imagem

- Girar o ajuste de foco grosseiro para aproximar a platina o mais próximo possível da objetiva $\times 20$ ou $\times 40$. Para evitar quebrar a lente objetiva e a lâmina, olhe para a objetiva e a platina pela frente ou pelo lado, não pelas oculares. Usar o foco grosseiro para ajustar a altura da platina para que a lâmina esteja quase em contato com a objetiva. Observar de que maneira o foco grosseiro deve ser girado para abaixar a platina, afastando-a da objetiva.
- Olhando pelas duas oculares, girar lentamente o ajuste de foco grosseiro para afastar a platina gradualmente da objetiva até que a amostra esteja aproximadamente em foco. Usar o botão de ajuste fino para obter o melhor foco.

Nota: Se o foco for difícil de encontrar, tente focar as extremidades de vidro fosco da lâmina para se aproximar do plano focal correto.

A3.4 Focando as oculares

- Com alguns microscópios, as duas oculares podem ser focadas de forma independente. Com outros, uma ocular é fixa e a outra pode ser focada.
- As oculares ajustáveis geralmente são marcadas com uma escala “+ / 0 / -”. Ajustar a ocular para “0” antes de iniciar este processo.
- Se uma ocular estiver fixa, olhar apenas através da ocular fixa (feche ou cubra o outro olho).
- Focalizar a imagem da amostra usando o ajuste de foco fino. É útil focar em um objeto que não se move, por exemplo um espermatozoide morto, partícula de poeira ou grade de micrômetro de platina.
- Focar a ocular ajustável olhando através dela e fechando ou cobrindo o olho sobre a ocular fixa. Girar o anel estriado na base da ocular para “+” ou “-” até que o foco seja apropriado para seu olho.

A3.5 Focando o condensador de luz

- Fechar o diafragma de campo (sobre a fonte de luz na base do microscópio).
- Elevar ou abaixar o condensador usando os pequenos botões à esquerda ou à direita da unidade do condensador até que as bordas do diafragma estejam no foco mais nítido possível e o círculo de luz seja pequeno e claro. Esta posição geralmente será alcançada quando o condensador estiver na posição mais alta. A borda da imagem da luz pode mudar de azul para vermelho quando o condensador estiver focalizado (aberração cromática) e as bordas do condensador permanecerão ligeiramente borradas. A luz pode ou não estar centrada.

Nota: Se a abertura do campo não tiver diafragma de íris, concentre-se em um objeto pontiagudo (por exemplo, uma ponta de lápis) colocado na fonte de luz.

A3.6. Centrando o condensador

- Centralizar o diafragma de campo com os botões de centralização do condensador. Estes são geralmente dois botões (usualmente estriados) saindo diagonalmente da frente ou do lado debaixo do condensador.
- Uma vez que a imagem da luz estiver centralizada, abrir o diafragma de campo para que a luz preencha apenas o campo de visão. Não abra o diafragma de campo além desse ponto.
- Fechar a abertura do condensador até que o brilho desapareça.

Nota: Diretamente atrás do botão direito de centralização do condensador, pode haver pequenos parafusos que prendem o condensador no lugar. Tenha cuidado para não girá-los quando estiver centralizando o condensador, pois soltá-los permitirá que todo o condensador seja removido do microscópio.

A3.7 Ajustando os anéis de fase

- Isso é feito com o uso de um telescópio de centralização, disponível do fabricante do microscópio.
- Colocar o anel de fase apropriado no condensador para a objetiva a ser usada.
- Remover uma ocular e substituí-la pelo telescópio de centragem. Focar o anel do telescópio centralizador segurando a base dele com uma mão e girando a parte superior com a outra mão enquanto olha através dela. Girar até que os dois anéis estejam em foco: um anel é escuro (anel de fase) e um claro (anel claro).
- Alinhar esses anéis de modo que eles fiquem concêntricos girando os botões de ajuste de fase localizados no condensador de fase. Esses botões geralmente estão localizados na parte de trás do condensador.
- Substituir o telescópio de centragem pela ocular do microscópio.

A3.8 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência é usada para detectar os núcleos de espermatozoides no procedimento de contagem sensível usando o corante Hoechst 33342 (ver Seção 2.11.2) e a reação acrossômica usando lectina marcada com FITC (ver Seção 4.4.1). Os máximos espectrais de excitação do corante Hoechst 33342 e FITC são, respectivamente, 346 nm e 494 nm, e os máximos de emissão correspondentes são 460 nm e 520 nm. Uma lente de fluorescência é necessária (ver Quadro A3.1). Cada modelo de microscópio terá, como equipamento opcional de compra, o conjunto de espelhos dicróicos e filtros de barreira necessários para examinar esses corantes.

APÊNDICE 4 Soluções padrão

Para todas as soluções, é necessário um fornecimento de água purificada (destilada, duplamente destilada ou deionizada).

A4.1 Biggers, Whitten e Whittingham

Solução padrão BWW (Biggers et al., 1971)

1. Para 1000 ml de água purificada, adicionar 5,54 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,356 g de cloreto de potássio (KCl), 0,294 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,250 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,162 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4).
2. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
3. Adicionar 1,0 ml (0,04%, 0,4 g/l) de vermelho de fenol por litro.

Nota: Esta solução pode ser armazenada por várias semanas a 4 °C.

Solução de trabalho BWW.

No dia do uso:

1. Suplementar 100 ml de solução padrão com 210 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 100 mg de D-glucose, 0,37 ml de xarope de lactato de sódio a 60% (v/v), 3 mg de piruvato de sódio, 350 mg de fração V de albumina de soro bovino, 10.000 unidades de penicilina e 10 mg de sulfato de estreptomicina.
2. Aquecer a 37 °C antes de usar em uma atmosfera de 5% (v/v) de CO_2 , 95% (v/v) de ar.

Nota 1: Para incubação no ar: adicionar 20 mmol/l de Hepes (sal de Na: 5,21 g/l) e reduzir NaHCO_3 a 0,366 g/l.

Nota 2: Para gradientes de densidade (consulte a Seção 5.5.1): preparar uma solução padrão concentrada 10 × usando 10 vezes os pesos especificados dos compostos, com exceção do vermelho de fenol. Depois de preparar o gradiente, suplementar 100 ml como acima.

A4.2 Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco

1. Glicose-PBS de Dulbecco: para 750 ml de água purificada, adicionar 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,1 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 2,16 g de hidrogenofosfato dissódico hepta-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1,00 g de D-glicose.
2. Dissolver 0,132 g de di-hidrato de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em 10 ml de água purificada e adicionar lentamente à solução anterior com agitação.
3. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
4. Fazer até 1000 ml com água purificada.

Nota 1: Para evitar a precipitação, adicionar CaCl_2 separadamente, lentamente e com agitação.

Nota 2: Se necessário, adicionar 0,3 g de albumina sérica bovina (BSA) (livre de ácidos graxos essenciais) por cada 100 ml, antes de usar.

A4.3 Meio de Earle

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 6,8 g de cloreto de sódio (NaCl), 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,14 g de monohidrato de di-hidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,4 g de cloreto de potássio (KCl), 0,20 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1,0 g de D-glicose.
2. Dissolver lentamente 0,20 g de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) na solução anterior, agitando.
3. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de ácido clorídrico (HCl) ou 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
4. Fazer até 1000 ml com água purificada.

Nota 1: Para incubação no ar: adicionar 20 mmol/l de Hepes (sal de Na: 5,21 g/l) e reduzir NaHCO_3 a 0,366 g/l.

Nota 2: Para gradientes de densidade (consulte a Seção 5.5.1): preparar uma solução concentrada de 10 × usando 10 vezes os pesos especificados dos compostos, com exceção do bicarbonato. Após a preparação do gradiente, completar 100 ml com 0,22 g de NaHCO_3 .

A4.4 Meio F-10 de Ham

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 7,4 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,285 g de cloreto de potássio (KCl), 0,154 g de fosfato monossódico de sódio (Na_2HPO_4), 0,153 g de heptaidrato de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,083 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,044 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 1,1 g de D-glicose.
2. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
3. Fazer até 1000 ml com água purificada.

Nota 1: Para incubação no ar: adicionar 20 mmol/l de Hepes (sal de Na: 5,21 g/l) e reduzir NaHCO_3 a 0,366 g/l.

Nota 2: Para gradientes de densidade (consulte a Seção 5.5.1): preparar uma solução concentrada de 10 × aumentando os pesos dos compostos em 10 vezes, com exceção do bicarbonato. Após a preparação do gradiente, completar 100 ml com 0,12 g de NaHCO_3 .

A4.5 Solução salina equilibrada de Hanks

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,4 g de cloreto de potássio (KCl), 0,35 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,185 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de cloreto de magnésio hexa-hidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de hepta-hidrato de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,06 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 0,048 g de di-hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) e 1,0 g de D-glicose.
2. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
3. Fazer até 1000 ml com água purificada.

A4.6 Fluido tubário humano

Fórmula original (Quinn et al., 1985):

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 5,931 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,35 g de cloreto de potássio (KCl), 0,05 g de hepta-hidrato de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,05 g de di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 2,1 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,5 g de D-glucose, 0,036 g de piruvato de sódio, 0,3 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 4,0 g de DL-lactato de sódio (xarope a 60% (v/v)).
2. Para 1 ml do meio acima, adicionar 10 μg de vermelho de fenol, 100 μg de penicilina e 50 μg de sulfato de estreptomicina.
3. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de ácido clorídrico (HCl).
4. Fazer até 1000 ml com água purificada.

Nota 1: Para incubação no ar: adicionar 20 mmol/l de Hepes (sal de Na: 5,21 g/l) e reduzir NaHCO_3 a 0,366 g/l.

Nota 2: Para gradientes de densidade (consulte a Seção 5.5.1): preparar uma solução concentrada 10 \times usando 10 vezes os pesos especificados dos compostos, com exceção do bicarbonato, piruvato e lactato. Após a preparação do gradiente, completar 100 ml com 0,21 g de NaHCO_3 , 0,0036 g de piruvato de sódio e 0,4 g de lactato de sódio.

A4.7 Meio de Krebs-Ringer

Meio de Krebs-Ringer (KRM), sem vermelho de fenol:

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 6,9 g de cloreto de sódio (NaCl), 2,1 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,35 g de cloreto de potássio (KCl), 0,32 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,18 g de sódio di-hidrogenofosfato di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,9 g de D-glicose.
2. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
3. Fazer até 1000 ml com água purificada.

A4.8 Solução salina Tris-tamponada

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 6,055 g de base Tris e 8,52 g de cloreto de sódio (NaCl).
2. Ajustar o pH para 8,2 com 1 mol/l de ácido clorídrico (HCl).
3. Fazer até 1000 ml com água purificada.

Nota: Uma solução concentrada 10x pode ser feita usando 10 vezes os pesos especificados dos compostos. Para uso, diluir 10 vezes com água purificada e ajustar o pH com 1 mol/l de HCl.

A4.9 Solução de Tyrode

1. Para 750 ml de água purificada, adicionar 0,2 g de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,05 g de hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4), 0,2 g de cloreto de magnésio hexa-hidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,0 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 1,0 g de D-glicose.
2. Ajustar o pH para 7,4 com 1 mol/l de ácido clorídrico (HCl) ou 1 mol/l de hidróxido de sódio (NaOH).
3. Fazer até 1000 ml com água purificada.
4. Se necessário, adicionar 0,3 g de BSA (livre de ácidos graxos essenciais) por cada 100 ml, antes de usar.

A4.10 Coloração de Papanicolaou

Os corantes disponíveis comercialmente são geralmente satisfatórios, mas a coloração pode ser preparada no laboratório.

Nota: Verificar a acidez da água purificada antes de preparar os diferentes graus de etanol. O pH deve ser 7,0.

EA-36 (equivalente a EA-50)

Constituintes

- | | |
|--|---------|
| 1. Eosina Y (índice de cor 45380) | 10 g |
| 2. Marrom Bismarck Y (índice de cor 21000) | 10 g |
| 3. Verde-metilo SF, amarelado (índice de cor 42095) | 10 g |
| 4. Água purificada | 300 ml |
| 5. Etanol 95% (v/v) | 2000 ml |
| 6. Ácido fosfotúngstico | 4 g |
| 7. Carbonato de lítio aquoso saturado (>1,3 g /100 ml) | 0,5 ml |

Soluções padrão

Preparar soluções separadas a 10% (100 g/l) de cada uma das colorações da seguinte forma:

1. Dissolver 10 g de eosina Y em 100 ml de água purificada.
2. Dissolver 10 g de marrom Bismarck Y em 100 ml de água purificada.
3. Dissolver 10 g de verde-metilo SF em 100 ml de água purificada.

Preparação

1. Para preparar 2 litros de corante, misturar 50 ml de solução padrão eosina Y com 10 ml da solução padrão marrom Bismarck Y e adicionar 12,5 ml de solução padrão verde-metilo SF.
2. Fazer até 2000 ml com etanol a 95% (v/v).
3. Adicionar 4 g de ácido fosfotúngstico.
4. Adicionar 0,5 ml de solução saturada de carbonato de lítio.
5. Misturar bem e guardar a temperatura ambiente em frascos bem fechados.

Nota 1: A solução é estável por 2 a 3 meses.

Nota 2: Passar por um filtro de 0,45 µm antes de usar.

Orange G6

Constituintes

- | | |
|--|---------|
| 1. Cristais Orange G (índice de cor 16230) | 10 g |
| 2. Água purificada | 100 ml |
| 3. Etanol 95% (v/v) | 1000 ml |
| 4. Ácido fosfotúngstico | 0,15 g |

Solução padrão número 1 (solução Orange G6, 10% (100 g/l))

1. Dissolver 10 g de cristais de Orange G em 100 ml de água purificada.
2. Agitar bem. Deixar repousar em um frasco marrom-escuro com tampa ou folha de alumínio à temperatura ambiente por 1 semana antes de usar.

Solução padrão número 2 (Orange G6, solução a 0,5%)

1. Para 50 ml da solução padrão número 1, adicionar 950 ml de etanol a 95% (v/v).
2. Adicionar 0,15 g de ácido fosfotúngstico.
3. Misturar bem. Armazenar em frascos marrom-escuros ou cobertos com folha de alumínio à temperatura ambiente.

Nota 1: Filtrar antes de usar.

Nota 2: A solução é estável por 2 a 3 meses.

Hematoxilina de Harris sem ácido acético

Constituintes

1. Hematoxilina (cristais escuros; índice de cor 75290)
2. Etanol 95% (v/v)
3. Dodeca-hidrato de sulfato de amônio de alumínio ($\text{Al}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
4. Óxido de mercúrio (HgO)

Preparação

1. Dissolver 160 g de dodeca-hidrato de sulfato de amônio de alumínio em 1600 ml de água purificada por aquecimento.
2. Dissolver 8 g de cristais de hematoxilina em 80 ml de etanol a 95% (v/v).
3. Adicionar a solução de hematoxilina à solução de sulfato de amônio de alumínio.
4. Aquecer a mistura a 95 °C.
5. Retirar a mistura do fogo e adicionar lentamente 6 g de óxido de mercúrio, mexendo.

Nota: A solução será de cor púrpura escura.

6. Mergulhar imediatamente o recipiente em um banho de água fria.
7. Filtrar quando a solução estiver fria.

8. Armazenar em frascos marrom-escuros ou cobertos com folha de alumínio à temperatura ambiente.
9. Deixar em repouso por 48 horas antes de usar.
10. Diluir a quantidade necessária com uma quantidade igual de água purificada.
11. Filtrar de novo.

Solução substituta de água de torneira de Scott

Nota: A solução de Scott é usada somente quando a água comum da torneira é insuficiente para retornar a cor azul ao núcleo; deve ser trocada com frequência, por ex. depois de enxaguar 20 a 25 lâminas.

Constituintes

1. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 3,5 g
2. Sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20,0 g
3. Vários cristais de timol (se necessário, como conservante)
4. Água purificada 1000 ml

Solução de etanol ácido

Constituintes

1. Etanol 99,5% (v/v) 300 ml
2. Ácido clorídrico concentrado (HCl) 2,0 ml
3. Água purificada 100 ml

Referências

- Biggers JD et al. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. Methods in mammalian embryology. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Quinn P et al. (1985). Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertility and Sterility, 44: 493-498.

APÊNDICE 5 Muco cervical

A5.1 Introdução

Os espermatozoides no muco cervical estão suspensos em um meio fluido. A interação dos espermatozoides com as secreções do trato reprodutivo feminino é de importância crítica para sua sobrevivência e funcionamento. Não existe atualmente nenhum método prático de avaliar os efeitos dos fluidos uterinos e tubários nos espermatozoides. No entanto, o muco cervical está prontamente disponível para amostragem e estudo.

O epitélio do colo do útero humano compreende diferentes tipos de células secretoras e a natureza e abundância dos grânulos de secreção variam em diferentes partes do colo do útero. As secreções dessas células contribuem para a formação do muco cervical. Os hormônios ovarianos regulam a secreção do muco cervical: o 17β -estradiol estimula a produção de grandes quantidades de muco aquoso e a progesterona inibe a atividade secretora das células epiteliais. A quantidade de muco cervical secretada mostra variações cíclicas. Em mulheres em idade reprodutiva com ciclo menstrual normal, a produção diária de muco varia de 500 μ l no meio do ciclo a menos de 100 μ l em outros momentos. Pequenas quantidades de líquido endometrial, tubário e possivelmente folicular também podem contribuir para o reservatório de muco cervical. Além disso, leucócitos e restos celulares dos epitélios uterino e cervical estão presentes.

O muco cervical é uma secreção heterogênea, contendo mais de 90% de água. Exibe uma série de propriedades reológicas:

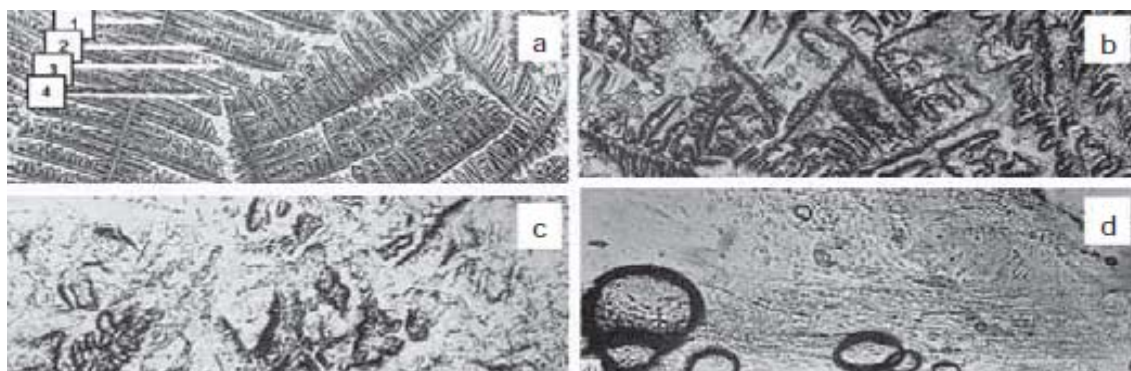
- A viscosidade (consistência) é influenciada pelo arranjo molecular e pelas concentrações proteicas e iônicas do muco cervical. O muco varia durante o ciclo menstrual de altamente viscoso (muitas vezes celular), pouco antes da menstruação, para aquoso no meio do ciclo, pouco antes da ovulação. Quando a ovulação é concluída, a viscosidade do muco começa a aumentar novamente.
- Filância é o termo usado para descrever a fibrosidade, a "capacidade de se tornar um fio" ou as características de elasticidade do muco cervical.
- "Figuras em samambaia" refere-se ao grau e padrão de cristalização observado quando o muco cervical é secado em uma superfície de vidro (Fig. A5.1).

O muco cervical é um hidrogel que compreende um componente de alta viscosidade e um componente de baixa viscosidade composto de eletrólitos, compostos orgânicos e proteínas solúveis. O componente de alta viscosidade é uma rede macromolecular de mucina, que influencia as propriedades reológicas do muco. A mucina cervical é um sistema fibrilar constituído por subunidades constituídas por um núcleo peptídico e cadeias laterais de oligossacáridos. A alteração cíclica nos constituintes do muco cervical influencia a capacidade dos espermatozoides de penetrar e sobreviver. Os espermatozoides podem penetrar no muco cervical humano de, aproximadamente, o nono dia de um ciclo normal de 28 dias. A penetrabilidade aumenta gradualmente para atingir um pico imediatamente antes da ovulação. A penetração espermática começa a diminuir antes que grandes mudanças nas propriedades do muco sejam aparentes. Variações individuais no tempo e no grau de penetrabilidade dos espermatozoides são comuns. Os espermatozoides móveis podem ser guiados por filamentos de

muco cervical até as criptas cervicais, onde podem ser retidos e liberados lentamente no útero e nas tubas uterinas.

Fig. A5.1 Exemplos de formação de “figuras em samambaia” no muco cervical seco ao ar em uma lâmina de vidro

(a) Ferning: 1, caule primário; 2, caule secundário; 3, caule terciário; 4, caule quaternário (escore 3); (b) principalmente caules primários e secundários (escore 2), mas alguns caules terciários também estão presentes; (c) cristalização fern atípica (escore 1); (d) sem cristalização (escore 0). As estruturas redondas são bolhas de ar. Ver Seção A5.3.3 para a explicação da pontuação.



Comentário: É importante avaliar a interação muco cervical-espermatozoide como parte de qualquer investigação completa de infertilidade. Um achado de interação anormal muco-espermatozoide pode ser uma indicação para inseminação artificial ou outras formas de reprodução assistida.

A5.2 Coleta e preservação do muco cervical

A5.2.1 Procedimento de coleta

Expor o colo do útero com um espéculo e limpar cuidadosamente a parte externa com um cotonete para remover o reservatório externo de contaminantes vaginais. Remover o muco exocervical com o cotonete ou com uma pinça. Recolher o muco cervical do canal endocervical por aspiração com uma seringa de muco, seringa de tuberculina (sem agulha), pipeta ou tubo de polietileno. A maneira pela qual a pressão de sucção é aplicada ao dispositivo de coleta deve ser padronizada. Avançar a ponta do dispositivo aproximadamente 1 cm no canal cervical antes de aplicar a sucção. Em seguida, manter a sucção quando o dispositivo for retirado. Pouco antes de o dispositivo ser completamente retirado do orifício cervical externo, liberar a pressão de aspiração. É então aconselhável fixar o cateter para proteger contra o acúmulo de bolhas de ar ou material vaginal no muco coletado quando o dispositivo for removido do canal cervical. Sempre que possível, a qualidade do muco deve ser avaliada imediatamente após da coleta. Se isso não for possível, o muco deve ser preservado (ver Seção A5.2.2) até que possa ser testado.

Quando o muco cervical precisar ser recolhido não apenas no meio do ciclo, a sua produção pode ser aumentada pela administração de 20-80 µg de etinilestradiol por dia durante 7-10 dias antes da coleta. Este procedimento produzirá uma secreção de muco mais hidratada e, portanto, menos viscosa

(Eggert-Kruse et al., 1989). Embora essa abordagem possa ser útil na avaliação da interação esperma-muco *in vitro*, ela não irá refletir necessariamente a situação *in vivo* para o casal quando os hormônios não são administrados.

A5.2.2 Armazenamento e preservação

O muco pode ser preservado no dispositivo de coleta original ou em pequenos tubos de ensaio selados com uma tampa ou com filme de laboratório autosselante para evitar a desidratação. Cuidados devem ser tomados para minimizar o espaço aéreo no recipiente de armazenamento. As amostras devem ser conservadas em um refrigerador a 4 °C por até 5 dias. Se possível, amostras de muco devem ser usadas dentro de 2 dias após a coleta; o intervalo entre a coleta e o uso deve ser sempre anotado. Os testes reológicos e de penetração espermática não devem ser realizados em amostras de muco que foram congeladas e descongeladas.

A5.3 Avaliação do muco cervical

A avaliação das propriedades do muco cervical inclui a avaliação do spinnbarkeit, ferning (cristalização), viscosidade e pH. O apêndice 6 contém um formulário de amostra para pontuar e registrar essas propriedades do muco cervical de acordo com o sistema desenvolvido por Moghissi (1976), com base em uma proposta original de Insler et al. (1972). A pontuação é derivada do volume de muco cervical coletado (ver Seção A5.3.1) e das quatro variáveis (ver Seções A5.3.2 a A5.3.5) descrevendo suas características e aparência. O pH do muco não está incluído no escore total do muco cervical, mas deve ser medido como um importante determinante da interação com os espermatozoides (Eggert-Kruse et al., 1993). A pontuação máxima é 15. Um escore maior que 10 é geralmente indicativo de bom muco cervical, favorecendo a penetração espermática; uma pontuação inferior a 10 pode significar que o muco cervical é desfavorável à penetração espermática.

A5.3.1 Volume

A viscosidade do muco dificulta a medição precisa do volume. Pode ser estimado a partir do comprimento do muco dentro da tubulação de um cateter de diâmetro conhecido (ver Quadro A5.1).

Quadro A5.1 Determinando o volume de muco coletado

O volume de uma preparação de muco (V , $\mu\text{l} = \text{mm}^3$) é obtido multiplicando a área da seção transversal da tubulação (A , mm^2) pelo comprimento (L , mm) contendo muco: $V = A \times L$. Área seccional $A = \pi r^2$, onde π é aproximadamente 3,142 e r é o raio da tubulação. Assim, um muco de 10 cm (100 mm) de comprimento em tubos de 2 mm de diâmetro ($A = 3,142 \times 1 \times 1 = 3,142 \text{ mm}^2$) tem um volume de $A \times L = 3,142 \times 100 = 314 \text{ mm}^3 = 314 \mu\text{l}$ ou 0,31 ml.

O volume é pontuado da seguinte forma:

0 = 0 ml

1 = 0,01–0,10 ml ou aproximadamente 0,1 ml

2 = 0,11–0,29 ml ou aproximadamente 0,2 ml

3 = > 0,3 ml ou aproximadamente 0,3 ml ou mais

A5.3.2 Viscosidade (consistência)

A viscosidade do muco cervical é o fator mais importante que influencia a penetração dos espermatozoides. Há pouca resistência à migração de espermatozoides através do muco cervical no meio do ciclo, mas o muco viscoso - tal como observado durante a fase luteal - forma a barreira mais formidável.

A viscosidade é pontuada da seguinte forma:

- 0 = muco pré-menstrual espesso e altamente viscoso
- 1 = muco de viscosidade intermediária
- 2 = muco levemente viscoso
- 3 = muco aquoso, minimamente viscoso, do meio do ciclo (pré-ovulatório)

A5.3.3 “Figuras em samambaia”

As “figuras em samambaia” (ver Fig. A5.1) é pontuado por exame do muco cervical que foi seco ao ar em lâminas de vidro para microscópio. Tais preparações revelam vários padrões de cristalização, que podem ter uma aparência como de samambaia. Dependendo da composição do muco, as “samambaias” podem ter apenas um caule primário, ou o caule pode-se ramificar uma, duas ou três vezes para produzir caules secundários, terciários e quaternários. Vários campos ao redor da preparação devem ser observados e a pontuação expressa como o maior grau de ramificação, que é típico da amostra.

Os tipos de samambaia podem ser muito variáveis, dependendo, por exemplo, da espessura da preparação e do número de células presentes. Uma preparação pode exibir mais de um estágio de samambaia: às vezes todos os estágios podem ser encontrados em uma preparação.

O ferning é pontuado da seguinte forma:

- 0 = sem cristalização
- 1 = formação de samambaia atípica
- 2 = ferning com caules primários e secundários
- 3 = ferning com caules terciários e quaternários

A5.3.4 Spinnbarkeit

Colocar uma gota de muco cervical em uma lâmina de microscópio e tocá-la com uma lamela ou uma segunda lâmina colocada transversalmente; em seguida, levantar suavemente a lamela ou a segunda lâmina. Estimar o comprimento do fio de muco cervical esticado entre as duas superfícies.

Spinnbarkeit é pontuado da seguinte forma:

- 0 = < 1 cm
- 1 = 1–4 cm
- 2 = 5–8 cm
- 3 = 9 cm ou mais

A5.3.5 Celularidade

Recomenda-se que toda contagem de células seja expressa em células por µl. Uma estimativa do número de leucócitos e outras células no muco cervical

é tradicionalmente baseada no número contado por campo de microscopia de alta potência (HPF) (ver Quadro A5.2).

Quadro A5.2 Volume observado por campo de alta potência em uma preparação de muco com 100 μm de profundidade

O volume de muco observado em cada campo microscópico depende da área do campo (πr^2 , onde π é aproximadamente 3,142 e r é o raio do campo microscópico) e da profundidade da câmara (aqui 100 μm). O diâmetro do campo microscópico pode ser medido com um micrômetro ou pode ser estimado dividindo o diâmetro da abertura da lente ocular pela ampliação da lente objetiva.

Com uma objetiva de 40 \times e uma ocular de 10 \times de abertura de 20 mm, o campo do microscópio tem um diâmetro de aproximadamente 500 μm (20 mm/40). Neste caso, $r = 250 \mu\text{m}$, $r^2 = 62.500 \mu\text{m}^2$, $\pi r^2 = 196.375 \mu\text{m}^2$ e o volume é 19.637.500 μm^3 ou cerca de 20 nl.

Assim, uma contagem de 10 células por HPF é aproximadamente equivalente a 10 células por 20 nl, ou 500 células por μl . Como o número de células contadas é baixo, o erro de amostragem é alto; uma contagem replicada de 10 tem um erro de amostragem de 22% (consulte a Tabela 2.2), portanto, o valor pode estar em qualquer lugar entre 280 e 720 células por μl .

Os escores de classificação das células são:

- 0 = > 20 células por HPF ou > 1000 células por μl
- 1 = 11–20 células por HPF ou 501–1000 células por μl
- 2 = 1–10 células por HPF ou 1–500 células por μl
- 3 = 0 células

A5.3.6 pH

O pH do muco do canal endocervical deve ser medido com papel de pH, variando de 6,0 a 10,0, in situ ou imediatamente após a coleta. Se o pH for medido in situ, deve-se tomar cuidado para evitar tocar o muco exocervical, que sempre tem um pH mais baixo (mais ácido) que o do muco no canal endocervical. Cuidados também devem ser tomados para evitar a contaminação com secreções vaginais, que têm um pH baixo.

Os espermatozoides são suscetíveis a alterações no pH do muco cervical. O muco ácido imobiliza os espermatozoides, enquanto o muco alcalino pode aumentar a motilidade. A alcalinidade excessiva do muco cervical (pH superior a 8,5), no entanto, pode afetar adversamente a viabilidade dos espermatozoides. O valor ideal de pH para a migração de espermatozoides e sua sobrevivência no muco cervical é entre 7,0 e 8,5, que é a faixa de pH do muco cervical normal da metade do ciclo. Embora um valor de pH entre 6,0 e 7,0 possa ser compatível com a penetração espermática, a motilidade é frequentemente prejudicada abaixo de pH 6,5 e os testes de interação muco cervical-esperma geralmente não são realizados se o pH do muco estiver abaixo de 7,0.

Em alguns casos, o muco cervical pode ser mais ácido. Isto pode ser devido a secreções anormais, à presença de uma infecção bacteriana ou contaminação com fluido vaginal.

Referências

- Eggert-Kruse W et al. (1989). Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51: 317–323.
- Eggert-Kruse W et al. (1993). The pH as an important determinant of sperm–mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59: 617–628.
- Insler V et al. (1972). The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10: 223–228.
- Moghissi KS (1976) Postcoital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27: 117–129.

APÊNDICE 6 **Formulários de registro para análises de sêmen e muco cervical**

A6.1 **Modelo para um formulário de registro de análise de sêmen**

Esta amostra de um formulário de registro é oferecida como modelo. Permite o registro das observações feitas durante a análise do sêmen, utilizando os métodos descritos neste manual. Pode ser adaptada para incluir variáveis derivadas, que são combinações de resultados dos dados primários (por exemplo, número total de células positivas para peroxidase por ejaculação). Quando usados para fins de pesquisa, os dados do registro de amostra podem ser inseridos diretamente em um banco de dados de computador e quaisquer variáveis derivadas podem ser calculadas eletronicamente.

A amostra do formulário de registro tem várias colunas para registrar os resultados das análises de sêmen realizadas em momentos diferentes. Esta é uma maneira conveniente de apresentar os resultados das amostras de sêmen em série. Pode ser útil adicionar espaço extra em certas partes do formulário para permitir a gravação de comentários e observações adicionais. Limites de referência e valores limiares de consenso (ver Apêndice 1, Tabela 1.1 e comentários), são apresentados entre colchetes, quando disponíveis.

Nome:			
Código:			
Data (dia/mês/ano)			
Coleta (1, no laboratório; 2, em casa)			
Hora da coleta (horas : minutos)			
Amostra enviada (horas : minutos)			
Análise começou (horas : minutos)			
Paciente			
Tempo de abstinência (dias)			
Medicação			
Dificuldades na coleta			
Sêmen			
Tratamento (ex. bromelaína)			
Amostra completa? (1, completa; 2, incompleta)			
Aparência (1, normal; 2, anormal)			
Viscosidade (1, normal; 2, anormal)			
Liquefação (1, normal; 2, anormal) (minutos)			
Aglutinação (1-4, A-E)			
pH $\geq 7,2$			
Volume (ml) $\geq 1,5$			
Espermatozoides			
Número total (10^6 por ejaculado) ≥ 39			
Concentração (10^6 por ml) ≥ 15			
Erro (%) se menos de 400 células contadas			
Vitalidade (% vivos) ≥ 58			
Motilidade total PR + NP (%) ≥ 40			
Progressiva PR (%) ≥ 32			
Não progressiva NP (%)			
Imóveis IM (%)			
Formas normais (%) ≥ 4			
Cabeças anormais (%)			
Peças intermediárias anormais (%)			
Peças principais anormais (%)			
Excesso de citoplasma residual (%)			
Teste MAR direto IgG (%) (3 ou 10 minutos) < 50			
Teste MAR direto IgA (%) (3 ou 10 minutos) < 50			
Teste IB direto IgG (%) com esferas < 50			
Teste IB direto IgA (%) com esferas < 50			
Células não espermáticas			
Células positivas para peroxidase, concentração (10^6 por ml) $< 1,0$			
Função da glândula acessória			
Zinco (μmol por ejaculado) $\geq 2,4$			
Frutose (μmol por ejaculado) ≥ 13			
α -Glucosidase (neutra) (mU/ejaculado) ≥ 20			
Técnico:			

A6.2 Modelo para um formulário de registro de muco cervical

Nome:
Código:
Data do primeiro e último dia do período menstrual (dia/mês/ano):

Pontuação diária do muco cervical				
Data (dia/mês/ano)				
Dia do ciclo				
Volume (0, 1, 2, 3)				
Viscosidade (0, 1, 2, 3)				
Ferning (0, 1, 2, 3)				
Spinnbarkeit (0, 1, 2, 3)				
Celularidade (0, 1, 2, 3)				
Pontuação total (max. 15)				
pH				

Teste pós-coito						
Data (dia/mês/ano)						
Tempo após o coito (horas)						
	Reservatóri o vaginal	Reservatório endocervical	Reservatório vaginal	Reservatóri o endocervic al	Reservatóri o vaginal	Reservatóri o endocervic al
Concentração do esperma (espermatozoides por μ l)						
Motilidade do espermazoide						
PR (%)						
NP (%)						
IM (%)						
Técnico:						

APÊNDICE 7 Erros de amostragem e controle de qualidade

A7.1 Erros na medição da concentração de espermatozoides

A7.1.1 Erros na avaliação de contagens

Para medir a concentração de espermatozoides, o número de espermatozoides em um volume fixo de sêmen diluído é avaliado em uma câmara de contagem. No entanto, uma única estimativa é de valor limitado sem alguma indicação de sua precisão. Isso é fornecido pelo intervalo de confiança, que tem uma probabilidade específica (o coeficiente de confiança ou possibilidade de cobertura) de conter o valor verdadeiro. A probabilidade mais comumente usada é de 0,95. O intervalo é então chamado de intervalo de confiança de 95% e as extremidades desse intervalo são os limites de confiança de 95% (Armitage et al., 2002).

Se os espermatozoides são distribuídos aleatoriamente por toda a câmara, o número em um dado volume segue a distribuição de Poisson, com variância igual ao número contado. O erro padrão (SE) de uma contagem (N) é sua raiz quadrada (\sqrt{N}), o erro de amostragem (% SE) é $100 \times (\sqrt{N}/N)$ e o intervalo de confiança de 95% (IC) é de aproximadamente $N \pm 1,96 \times SE$ (ou $N \pm$ aproximadamente $2 \times SE$).

Nota: Estes valores são apenas aproximados, pois os limites de confiança nem sempre são simétricos em relação à estimativa. O intervalo exato de confiança de 95%, com base nas propriedades da distribuição de Poisson, são 361,76–441,21 para uma contagem de 400; 81,36–121,66 para uma contagem de 100; 4,80–18,39 para uma contagem de 10; 0,025–5,572 para uma contagem de 1; e 0,0–3,7 para uma contagem de 0.

A7.1.2 Acordo entre contagens replicadas

Recomenda-se a repetição de contagens em duas diluições separadas de cada amostra de sêmen, para considerar a possível distribuição irregular dos espermatozoides, apesar da mistura cuidadosa (ver Seção 2.4.1). Avaliar a mesma câmara duas vezes, ou avaliar ambos os lados de uma câmara cheia de uma única diluição não é uma replicação verdadeira, pois isso não permite que erros de preparação, mistura ou diluição sejam detectados.

Espera-se que a diferença entre as contagens independentes seja zero, com um erro padrão igual à raiz quadrada da soma das duas contagens. Assim, $z = (N_1 - N_2) / \sqrt{(N_1 + N_2)}$ deve ser $< 1,96$ apenas por acaso; se for, os valores são aceitos. Se z é $> 1,96$, novas diluições de replicação são feitas. A Fig. A7.1 apresenta os valores arredondados aceitáveis para $N_1 - N_2$.

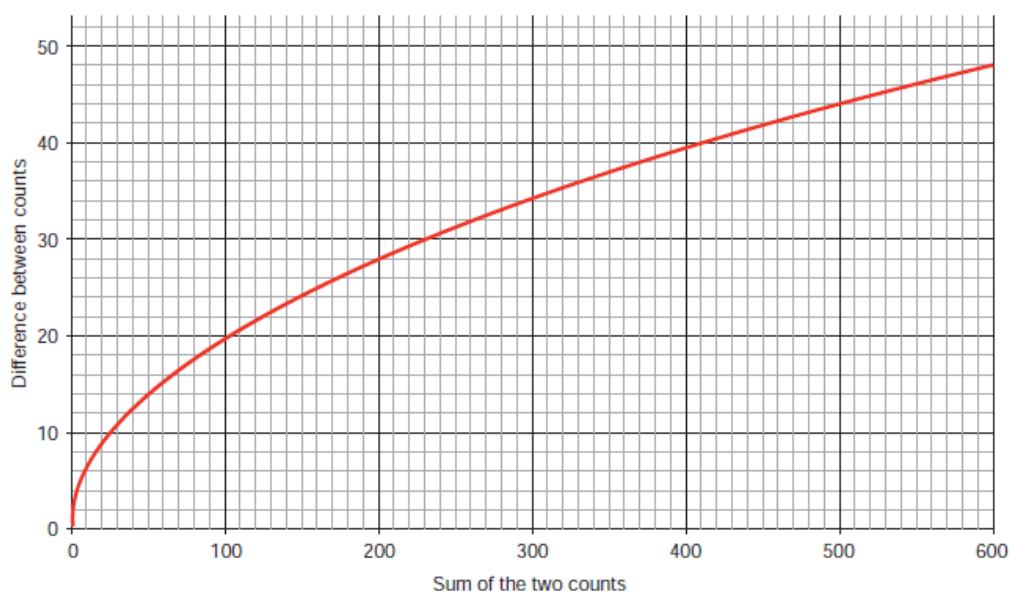
Por exemplo, para uma contagem média de 200 espermatozoides (soma 400), a diferença entre as contagens replicadas poderia ser tão grande quanto 39, portanto as duas contagens poderiam ser 180,5 ($200 - 19,5$) e 219,5 ($200 + 19,5$) somente por acaso.

A Tabela A7.1 resume os dados mostrados na Figura A7.1 e pode ser usada para avaliar a concordância entre as contagens replicadas (ver Seções 2.8.3 e 2.11).

Para a contagem de espermatozoides de rotina, recomenda-se que pelo menos 200 espermatozoides sejam contados em cada réplica, de modo que um total de cerca de 400 células sejam contadas; o erro de amostragem é então inferior a 5% (ver Tabela 2.2). Com um número de espermatozoides muito baixo, erros de amostragem mais elevados podem ser inevitáveis (ver Seções 2.11.1 e 2.11.2), caso em que o erro de amostragem (% SE) para o número de espermatozoides contados (ver Tabela 2.2) deve ser reportado.

Fig. A7.1 Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas em função do número total de espermatozoides avaliados

A linha mostra a diferença máxima entre as contagens replicadas que devem ocorrer apenas por acaso.



Difference between counts	Diferença entre contagens
Sum of the two counts	Soma das duas contagens

Tabela A7.1 Diferenças aceitáveis entre duas contagens replicadas para uma determinada soma

Soma	Diferença*	Soma	Diferença*	Soma	Diferença*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

A7.2 A importância de entender erros de amostragem

Este manual coloca grande ênfase na contagem de um número suficiente de espermatozoides e na obtenção de estimativas replicadas para concordar dentro de certos limites. Isso é necessário porque esses procedimentos aumentam a certeza de que as concentrações ou contagens totais geradas estão próximas dos valores verdadeiros (mas desconhecidos). Se poucos espermatozoides forem contados, a concentração calculada será imprecisa. Se não for possível contar um total de pelo menos 400 espermatozoides, isso deve ser indicado no formulário do relatório e o erro envolvido registrado (ver Tabela 2.2).

A precisão é obtida, de uma melhor maneira, contando em câmaras profundas, com grandes áreas de grade que contenham um grande número de espermatozoides, em vez de câmaras rasas com grades pequenas contendo poucos espermatozoides. Para facilitar a contagem, o sêmen deve ser diluído em fixador o suficiente para que haja pouca sobreposição de células não móveis. O exemplo abaixo ilustra a diferença entre as câmaras para obter uma medição precisa para uma amostra de sêmen com baixa concentração de espermatozoides.

Para uma câmara de baixo volume com uma grade de 1 mm × 1 mm cheia de espermatozoides não diluídos:

- Se a concentração real de espermatozoides for 1×10^6 por ml, existem 1000 espermatozoides por μl ou 1 espermatozoide por nl.
- Em uma câmara de 10 μm de profundidade com uma grade de 1 mm × 1 mm, haverá 10 espermatozoides em toda a grade de 10 nl.
- O erro associado à contagem de apenas 10 espermatozoides é de 32% e o intervalo de confiança de 95% $10 \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ ($= 10 \pm 6,2$) (ver Tabela 2.2).
- Este grande intervalo de confiança significa que a contagem verdadeira pode ser entre 4 espermatozoides ($10 - 6$) e 16 espermatozoides ($10 + 6$) no volume total de 10 nl.
- Assim, a estimativa da concentração situa-se entre 400.000 e 1.600.000 espermatozoides por ml de sêmen.
- Na prática, isto significa que a melhor estimativa para um volume de 50 μl é que contém entre 20.000 e 80.000 espermatozoides.
- Se duas preparações replicadas tivessem sido examinadas, os valores correspondentes para os 20 espermatozoides observados seriam, do erro de 22%, um intervalo de confiança de $20 \pm 8,8$, números reais de 11 ($20 - 9$) ou 29 ($20 + 9$) em o volume total de 20 nl, uma estimativa do valor real entre 550.000 espermatozoides/ml e 1.450.000 espermatozoides/ml de sêmen e entre 27.500 e 72.500 espermatozoides por alíquota de 50 μl .

Para uma câmara de grande volume com nove grelhas de 1 mm × 1 mm com sêmen diluído 1 + 1 (1: 2):

- Se a concentração real de espermatozoides for 1×10^6 por ml e for feita uma diluição de 1 + 1 (1: 2) (ver Seção 2.8), haverá 500.000 espermatozoides por ml, 500 espermatozoides por μl ou 0,5 espermatozoides por nl.
- Em uma câmara de 100 μm de profundidade, com várias grades no chão de 1 mm × 1 mm (100 nl por grade), haverá 200 espermatozoides em quatro grades (400 nl), 400 nas duas réplicas (800 nl)

- O erro associado à contagem de 400 espermatozoides é de 5% e o intervalo de confiança de 95% $400 \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ ($= 400 \pm 39$) (ver Tabela 2.2).
- Este intervalo de confiança significa que a contagem verdadeira pode ser entre 360 espermatozoides ($400-40$) e 440 espermatozoides ($400 + 40$) no volume total de 800 nl de sêmen diluído 1 + 1 (1: 2).
- Assim, a estimativa da concentração situa-se entre 900.000 e 1.100.000 espermatozoides por ml de sêmen não diluído.
- Na prática, isto significa que um volume de 50 μ l contém entre 45.000 e 55.000 espermatozoides.

A7.3 Erros na medição de porcentagens

A7.3.1 Erros na avaliação de porcentagens

Quando os espermatozoides são classificados em duas classes (como a morfologia normal ou anormal, móveis ou imóveis, vivos ou mortos, com ou sem reação de acrossomo, fundidos com ovos de hamster livres de zona ou não), os percentuais seguem a distribuição binomial. Para esta distribuição, o erro padrão da porcentagem estimada (p) dentro de uma classe depende da porcentagem verdadeira, mas desconhecida, bem como do número de espermatozoides contados (N). O erro padrão é $\sqrt{p(100-p)/N}$ e um intervalo de confiança aproximado pode ser construído a partir da distribuição normal. Essa é uma boa aproximação para valores no intervalo de 20–80%.

- Se 100 espermatozoides forem contados e a porcentagem com morfologia normal é de 20%, o erro padrão da porcentagem estimada de espermatozoides normais é $\sqrt{(20(100-20)/100)} = \sqrt{((20 \times 80)/100)} = \sqrt{(1600/100)} = 4\%$. O limite de confiança de 95% é $\pm 1,96 \times 4\%$ ou $\pm 7,8\%$, e o intervalo de confiança correspondente é 12,2–27,8%.
- Se 200 espermatozoides forem contados, o erro padrão é $\sqrt{(20(100-20)/200)} = \sqrt{((20 \times 80)/200)} = \sqrt{(1600/200)} = 2,8\%$. O limite de confiança de 95% é $\pm 1,96 \times 2,8\%$ ou $\pm 5,5\%$, e o intervalo de confiança correspondente é 14,5–25,5%.
- Se 400 espermatozoides forem contados, o erro padrão é $\sqrt{(20(100-20)/400)} = \sqrt{((20 \times 80)/400)} = \sqrt{(1600/400)} = 2,0\%$. O limite de confiança de 95% é $\pm 1,96 \times 2\%$ ou $\pm 3,9\%$, e o intervalo de confiança correspondente é 16,1–23,9%.

Fora do intervalo de 20 a 80%, é mais apropriado usar a transformação angular (raiz quadrada do arco seno) $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$. Isto tem a propriedade de que o desvio padrão de z é $1/(2\sqrt{N})$ e, portanto, depende apenas do número de espermatozoides contados e não da verdadeira (mas desconhecida) porcentagem. Uma alternativa é calcular os limites de confiança binomial exatos usando um dos vários pacotes de software estatísticos amplamente disponíveis.

A7.3.2 Acordo entre porcentagens replicadas

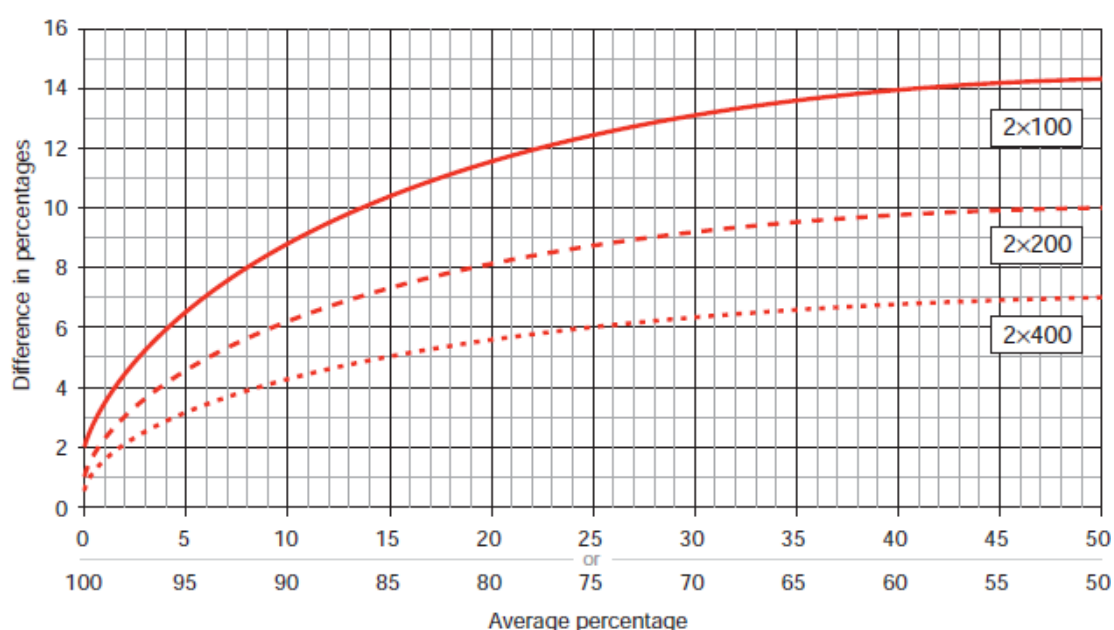
Recomenda-se que avaliações de porcentagens replicadas (p_1 e p_2) sejam feitas em N espermatozoides em cada amostra e comparadas. O limite da diferença esperada d (onde $d = |p_1 - p_2|$) é $1,96 (\sqrt{2\bar{p}(100 - \bar{p})/N})$ onde $\bar{p} = (p_1 + p_2)/2$. A diferença esperada entre as avaliações independentes é zero, com

erro padrão dependente da porcentagem estimada e do número total de espermatozoides contados.

Os grandes erros estatísticos associados à contagem de menos de 200 espermatozoides por réplica são aparentes na Figura A7.2, que mostra os intervalos de confiança exatos de 95% para concordância entre porcentagens para contagens replicadas de 100, 200 e 400 espermatozoides (ou seja, números totais de espermatozoides 200, 400 e 800). Também mostra que o erro é simétrico em torno de 50%, com um máximo de 50% e mínimo em 0% e 100%.

Fig. A7.2 As diferenças aceitáveis entre duas avaliações de porcentagem replicadas em função da porcentagem real e do número total de espermatozoides avaliados

As linhas mostram as diferenças que devem ocorrer apenas por acaso (limites de confiança de 95%) para porcentagens estimadas replicadas de 100 (total 200: superior, linha sólida), 200 (total 400: médio, linha pontilhada) e 400 (total 800: inferior, linha tracejada) espermatozoides.



Difference in percentages	Diferença nas porcentagens
Average percentage	Porcentagem média
or	ou

As diferenças aceitáveis entre as réplicas podem ser lidas neste gráfico. Para um total de 200 espermatozoides (100 por réplica) e uma porcentagem real de 5% (ou 95%), o limite superior de confiança de 95% para a diferença é de 6,6%. Em média, 19 das 20 avaliações repetidas da mesma amostra serão entre 2,42% e 9,00%; uma em cada 20 dará um resultado fora desses limites apenas por acaso. Para um total de 800 espermatozoides (400 por repetição: linha tracejada) e uma porcentagem real de 5% (ou 95%), o limite superior de confiança de 95% para a diferença é de 3,1% e os limites de confiança de 95% são 3,1% e 7,6%. Da mesma forma, se um total de 400 espermatozoides for contado (200 por réplica; linha pontilhada), para um valor real de 20% (ou 80%), o limite superior de confiança de 95% é 8,1%, com limites entre 16,2% e 24,3%.

As Tabelas A7.2, A7.3 e A7.4 apresentam dados sobre as diferenças aceitáveis entre os replicados (aqueles que ocorrem apenas por acaso) para um intervalo de percentagens estimadas a partir de números diferentes de espermatozoides totais contados. Estes podem ser mais úteis do que o gráfico (Fig. A7.2) para avaliar a concordância entre as percentagens replicadas de espermatozoides que são morfologicamente normais, móveis, viáveis ou com reação acrossômica.

Tabela A7.2 Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 100 espermatozoides (total de 200 contados)

Média (%)	Diferença*	Média (%)	Diferença*
0	2	67-74	13
1	3	75-80	12
2	4	81-84	11
3	5	85-87	10
4	6	88-90	9
5-6	7	91-93	8
7-9	8	94-95	7
10-12	9	96	6
13-15	10	97	5
16-19	11	98	4
20-25	12	99	3
26-33	13	100	2
34-66	14		

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

Tabela A7.3 Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 200 espermatozoides (total de 400 contados)

Média (%)	Diferença*	Média (%)	Diferença*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

Tabela A7.4 Diferenças aceitáveis entre duas percentagens para uma média dada, determinadas a partir de contagens replicadas de 400 espermatozoides (total de 800 contados)

Média (%)	Diferença*	Média (%)	Diferença*
0	0	70-81	6

1-3	2	82-88	5
4-6	3	89-93	4
7-11	4	94-96	3
12-18	5	97-99	2
19-30	6	100	0
31-69	7		

* Baseado no intervalo de confiança de 95% arredondado.

A7.4 Produção de amostras de sêmen para controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade devem idealmente ser representativas da variedade de amostras de sêmen processadas no laboratório. Se apenas um pequeno número de amostras de QC deve ser analisado, elas devem ser as mais relevantes para a atividade principal no laboratório. Por exemplo, no laboratório de um serviço de infertilidade, podem ser escolhidos intervalos clinicamente significativos (concentração de 15×10^6 a 50×10^6 por ml, motilidade progressiva de 30 a 50% e morfologia normal abaixo de 5%).

- Alíquotas de amostras de sêmen reunidas podem ser armazenadas congeladas, ou a 4 °C com um conservante, e analisadas, em intervalos, para concentração espermática.
- Os espermatozoides podem não sobreviver suficientemente bem à criopreservação para serem uma fonte útil de materiais para QC, internos e externos, para testes de anticorpos e de motilidade.
- Fitas de vídeo, CDs e DVDs também podem ser usados para avaliação da motilidade dos espermatozoides.
- Fotografias, fitas de vídeo, CDs e DVDs podem ser usados para avaliação da morfologia dos espermatozoides.
- As gravações em vídeo são particularmente úteis para o treinamento em avaliação de motilidade e morfologia, mas seu uso deve complementar, não substituir, avaliações replicadas de amostras de sêmen.
- As lâminas de sêmen coradas podem ser usadas para controle de qualidade de morfologia. Esfregaços fixos também podem ser armazenados e usados para monitorar colorações. As lâminas coradas podem se deteriorar com o tempo, dependendo da qualidade do procedimento de fixação ou coloração. No entanto, as lâminas coradas com o procedimento de Papanicolaou, descrito neste manual, e armazenadas no escuro à temperatura ambiente devem durar meses ou até anos.
- Soro positivo para anticorpos espermáticos pode ser usado para QC de testes indiretos com imunoesferas, mas não é recomendado para uso em testes diretos com imunoesferas.

A7.5 Preparação de uma gravação de vídeo para controle de qualidade interno de análise de motilidade espermática

Este protocolo descreve como preparar uma gravação de vídeo para ser usada no controle de qualidade dos procedimentos manuais de avaliação da mobilidade.

- Registrar pelo menos cinco e até 10 campos para imitar os vários campos avaliados para análise de motilidade durante a avaliação do sêmen e para permitir que pelo menos 400 espermatozoides sejam avaliados.

- A gravação de vídeo deve conter imagens de várias amostras diferentes de sêmen, cobrindo a faixa de motilidade tipicamente vista durante a avaliação de rotina do sêmen.
- A fita de vídeo pode simplesmente ter cinco campos de alguns espécimes de sêmen diferentes; em outros casos, um registro mais complexo pode ser necessário, por exemplo, para padronização entre laboratórios ou em um estudo multicêntrico. Neste caso, mais amostras de sêmen poderiam ser usadas e as amostras poderiam ser repetidas aleatoriamente durante todo o vídeo. Amostras repetidas permitem estimar a precisão intratécnica.

A7.5.1 Equipamento adicional

Além do equipamento de rotina para estimar a mobilidade, a preparação de gravações para controle de qualidade requer:

- Um gravador de vídeo ou computador com uma unidade de CD-RW ou DVD-RW;
- Um dispositivo de marcação para codificar a gravação de vídeo, como uma lâmina com números gravados em sua superfície (um England Finder) ou gerador de tempo.

A7.5.2 Procedimento

- Se várias amostras de sêmen estiverem disponíveis, toda a gravação de vídeo pode ser preparada em uma sessão; caso contrário, as amostras podem ser gravadas à medida que se tornam disponíveis.
- Se a motilidade é tipicamente avaliada à temperatura ambiente, as gravações devem ser feitas à temperatura ambiente. Da mesma forma, se a mobilidade é tipicamente avaliada a 37 °C, então as gravações devem ser feitas à mesma temperatura.

Nota: Se a gravação deve ser feita a 37 °C, o aquecedor de fase deve ser ligado e com permissão para atingir uma temperatura estável pelo menos 10 minutos antes de usar.

- Preparar uma gravação de campos suficientes para garantir que 400 espermatozoides sejam registrados a partir de várias amostras diferentes de sêmen.
- Para espécimes com baixa concentração de sêmen, mais de 10 campos podem ser necessários para fornecer um número adequado de espermatozoides para pontuação. A gravação de vídeo de 10 campos levará vários minutos.
- A gravação de vídeo pode ser feita quando uma lâmina com lamínula ou uma câmara fixa de 20 µm de profundidade for usada para a análise.

Nota 1: Quando são usadas lâminas descartáveis para a câmara de contagem, a mobilidade será estável por um período de tempo maior do que quando são usadas lâminas e lamínulas. Isso permitirá que 10 (ou mais) campos sejam gravados a partir da mesma preparação.

Nota 2: Quando lâminas e lamínulas são usadas, pode ser necessário usar várias durante a gravação do vídeo, para evitar um declínio perceptível na mobilidade ao longo do tempo.

- Identificar várias amostras de sêmen com uma faixa de valores de motilidade.

- Cada amostra deve ter um código único no vídeo. A codificação pode variar desde, simplesmente, marcar cada amostra, até marcar cada campo de cada amostra. Por exemplo, o primeiro marcador de amostra pode estar no início do primeiro campo, sem outra codificação até que o segundo espécime apareça. Alternativamente, a codificação poderia incluir marcações de cada campo individual, isto é, o primeiro campo da primeira amostra seria marcado 01-01, o segundo campo da primeira amostra seria marcado 01-02, etc. Este sistema de marcação mais elaborado ajuda os técnicos a rastrear onde estão durante a análise.

Nota 1: É útil ter seções curtas em branco no vídeo entre campos ou entre espécimes. Isso permite que o técnico reconheça o início do novo segmento.

Nota 2: A maneira mais fácil de obter um segmento em branco durante a gravação é cobrir a fonte de luz.

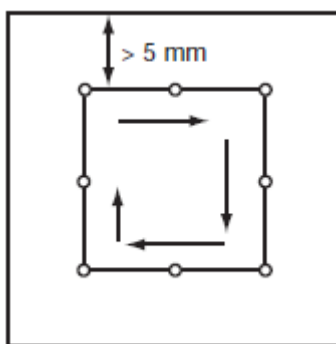
Nota 3: Isso também pode ser feito antes de pausar o gravador de vídeo; a “pausa” deve sempre ser usada em vez do botão “stop”, pois o botão “stop” pode causar ruído ou estática no vídeo.

- Gravar uma imagem de um micrômetro de platina por 10 segundos na ampliação que será usada para gravar as amostras. A ampliação deve fornecer uma imagem no monitor similar àquela usada para análise microscópica visual. A imagem micrométrica da platina fornece um registro permanente da ampliação, que permite a calibração da grade de acetato sobreposta à tela para uso durante a análise da fita de vídeo ou para calibração de um instrumento CASA.
- Registrar a imagem de codificação da primeira amostra por 5 a 7 segundos. No final deste tempo, bloquear a fonte de luz por 3 segundos para dar uma imagem em branco para servir como um marcador; então pausar a gravação.
- Identificar a primeira amostra de sêmen a ser usada para gravação. Colocar 10 μl de sêmen bem misturado numa lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamela de 22 mm x 22 mm, ou carregar uma câmara de deslizamento fixa com 7 μl de sêmen bem misturado. Deixar a amostra assentar por alguns segundos (a 37 °C, se necessário) até que a deriva tenha parado. Registrar 10 (ou mais) campos, seguindo o padrão mostrado na Fig. A7.3. Para QC CASA, a concentração espermática não deve exceder 50×10^6 por ml; amostras mais concentradas podem ter de ser diluídas em plasma seminal homólogo (ver Seção 3.5.2).
- Escolher o primeiro campo próximo à seção superior esquerda da lamínula ou câmara, a pelo menos 5 mm da borda. Registrar o campo por 15 segundos, mantendo o microscópio e o palco o mais parado possível. Após 15 segundos, gravar um espaço de 3 segundos e pausar a gravação. Se campos individuais estiverem sendo codificados, alterar o número do código e gravar uma imagem contendo apenas o número do código por 5 a 7 segundos.
- Seguindo o padrão mostrado na Fig. A7.3, localizar um segundo campo móvel na lâmina ou na câmara e registrar esse campo por 15 segundos. Novamente, registrar um espaço em branco de 3 segundos no final dos 15 segundos. Pausar a gravação e, se desejar, alterar o número do código para indicar o terceiro campo. Continuar gravando desta forma até que um total de pelo menos 400 espermatozoides (10 campos ou mais, dependendo da concentração) tenham sido capturados. Depois de gravar o campo final e um espaço em branco de 3 segundos, parar a gravação.

- Preparar uma segunda amostra. Gravar a imagem de codificação da segunda amostra por 5 a 7 segundos, seguida de uma pausa de 3 segundos.
- Registrar a segunda amostra de acordo com as etapas acima, registrando 10 ou mais campos durante 15 segundos cada, com um espaço em branco entre cada campo e um espaço em branco no final do campo final.
- Repetir este processo até que o número desejado de amostras tenha sido gravado em vídeo.

Fig. A7.3 Dicas para avaliar a motilidade dos espermatozoides

Análise sistemática de campos para gravação de vídeo de motilidade espermática a pelo menos 5 mm das bordas da lamínula.



Nota: Se desejar uma gravação de vídeo de motilidade IQC mais complexa, contendo amostras repetidas aleatoriamente, é necessário um segundo gravador ou um computador equipado com software de edição de vídeo especializado. Nesse caso, cada amostra deve ser gravada em vídeo separadamente, com apenas os campos marcados. O número da amostra não deve ser gravado, pois isso mudará à medida que a amostra for repetida na gravação. Se um computador equipado com software de edição de vídeo estiver disponível, as imagens de cada amostra poderão ser digitalizadas e combinadas conforme desejado em um DVD.

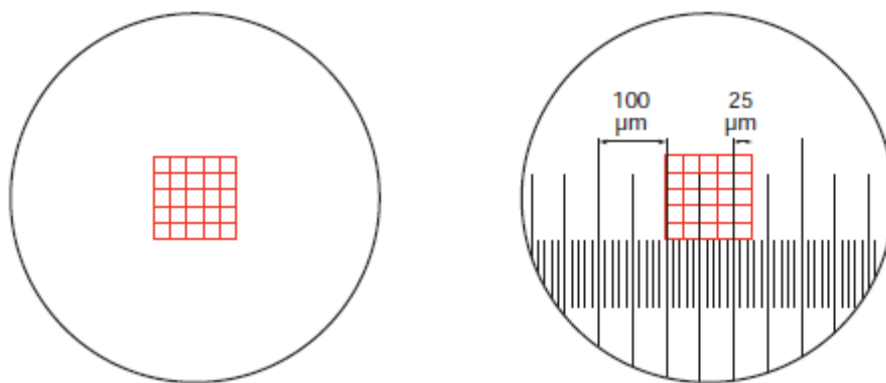
A7.5.3 Análise da gravação de vídeo

- Desenhar uma grade em acetato e colocá-la sobre o monitor de vídeo para ser usada durante a análise da gravação de vídeo, conforme detalhado abaixo. Isso imitará a grade usada na ocular durante a análise microscópica (ver Fig. A7.4a).

Fig. A7.4 Visualização através de uma ocular com retículo (grade vermelha)

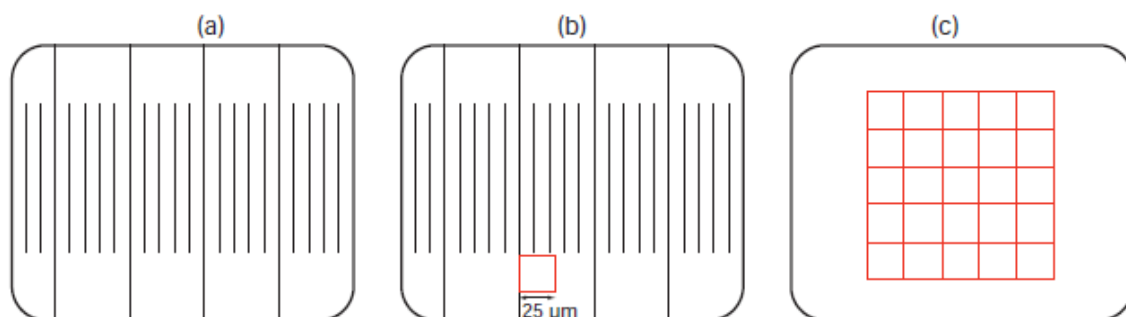
(a) ocular única

(b) vista no micrômetro de platina



- Colocar o micrômetro de platina no microscópio na ampliação usada para análise de motilidade. Olhando pela ocular com retículo (veja a Fig. A7.4), medir o tamanho das seções da grade usando o micrômetro de platina. Neste exemplo, a grade do retículo é de $125\ \mu\text{m} \times 125\ \mu\text{m}$ e cada quadrado é $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ (Fig. A7.4b). Anotar essas medições.
- Reproduzir a gravação através do monitor de vídeo e fazer uma pausa na imagem do micrômetro (Fig. A7.5a).
- Colar uma folha de acetato sobre a tela e desenhar um quadrado do tamanho de um quadrado da grade do retículo da ocular, conforme medido acima (ver Fig. A7.5b).
- Completar a imagem da grade inteira do retículo da ocular (25 quadrados) (Fig. A7.5c).
- Para analisar a gravação de vídeo, segurar a grade de acetato sobre a tela do monitor de vídeo. A análise deve ser feita em uma seção padronizada da grade, por ex. as duas primeiras linhas ou as três linhas do meio.
- Pontuar avaliações replicadas de 200 espermatozoides para cada segmento registrado.

Fig. A7.5 Visualização da imagem gravada em vídeo do micrômetro da platina no monitor e no acetato desenhado; veja o texto para explicação



A7.6 Preparação de sêmen diluído para controle interno da qualidade na determinação da concentração espermática

A7.6.1 Considerações gerais

- Algumas etapas do procedimento para determinar a concentração espermática no sêmen podem ser monitoradas usando amostras de sêmen, preparadas no laboratório, diluídas e preservadas.

- As amostras IQC devem ser representativas da faixa de concentrações normalmente vistas no laboratório durante a avaliação de rotina de sêmen.
- Diluir o sêmen em um conservante e colocar alíquotas em frascos de armazenamento. Estes podem ser refrigerados e usados posteriormente para contagem.
- Ao preparar as suspensões, tomar cuidado para que a amostra seja misturada completamente, para garantir que os frascos preparados a partir da mesma amostra contenham concentrações idênticas de espermatozoides. Desta forma, as diferenças nas contagens das amostras IQC podem ser atribuídas a problemas no procedimento de contagem.

- Diluir as amostras IQC preservadas novamente antes de avaliar a concentração em um hemocítmetro. Usar a diluição final que é utilizada no laboratório durante a contagem de rotina. Isso garante que a concentração de detritos de fundo e outras células não espermáticas será semelhante à observada durante a avaliação de rotina. Por exemplo, se o sêmen for inicialmente diluído com um volume igual de conservante, uma diluição adicional de 1 + 9 (1: 10) produzirá uma diluição final de 1: 20.
- Quando se deseja uma amostra preservada com baixa concentração de espermatozoides, é melhor começar com uma amostra de sêmen de baixa concentração em vez de fazer uma grande diluição de uma amostra mais concentrada. Isso garantirá que o fundo seja semelhante ao observado durante a análise de rotina do sêmen.
- As preparações de espermatozoides “swim-up” não contêm os detritos, as cabeças soltas e a contaminação com fragmentos de células observados durante a avaliação de rotina do sêmen e são mais bem usados apenas para monitorar a contagem de suspensões espermáticas selecionadas de maneira semelhante.
- O número de suspensões de espermatozoides para IQC preparados de uma vez só dependerá do número de técnicos e da frequência de contagem.
- Sêmen diluído, preservado sob refrigeração, deve permanecer estável por pelo menos 4 meses.

A7.6.2 Reagentes

Qualquer um dos três conservantes pode ser usado:

- Formalina: 10% (v/v) formaldeído. Para 27 ml de água purificada, adicionar 10 ml de formaldeído 37% (v/v).
- Azida (Jørgensen et al., 2001): azida de sódio 3 mol/l (NaN_3). Dissolver 19,5 g de NaN_3 em 100 ml de água purificada.
- Solução de prevenção da aglutinação (APSYS) (Brazil et al., 2004). Para 100 ml de água purificada, adicionar 1,0 g de albumina de soro bovino (BSA), 2,0 g de polivinilpirrolidona (PVP), 0,90 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 ml de detergente Triton X-100, 0,004 ml de agente antiespuma de silicone e 0,10 g de azida de sódio. Misturar bem e passar por um filtro de 0,45 μm para eliminar detritos. Armazenar a 4 °C.

Nota: O bactericida azida de sódio pode ser omitido da APSYS para tornar a solução não tóxica. No entanto, tais soluções devem ser descartadas se contaminadas.

A7.6.3 Suprimentos adicionais

Além do equipamento de rotina para estimar a concentração de espermatozoides, a preparação de amostras de QC requer:

- Criotubos ou outros pequenos tubos com tampas apertadas para armazenamento;
- Marcadores permanentes para rotulagem de tubos.

A7.6.4 Procedimento

1. Identificar amostras de sêmen com a concentração próxima à desejada. O volume de sêmen preservado requerido varia de acordo com as

necessidades do laboratório. Utilizar o volume total de sêmen disponível ou preparar 4 ml de suspensão de esperma diluído para cada concentração.

2. Assim que possível, após a coleta do sêmen, diluí-lo com conservante. Se o APSIS for utilizado para diluição e preservação, quanto maior o tempo antes da diluição, maiores as chances de formação de cristais após a diluição. Estes cristais podem interferir com o carregamento da câmara e a contagem dos espermatozoides.
3. Transferir o volume de sêmen necessário para um tubo de centrifuga de 15 ml. Para cada ml de sêmen, adicionar 100 µl de formalina a 10% (v/v), 10 µl de azida a 3 mol/l ou 1 ml de APSIS.
4. Rotular todos os frascos a serem usados para armazenamento das amostras com informações de identificação e data de preparação. Tampas devem ser removidas e os frascos colocados em uma prateleira para permitir um enchimento rápido e fácil.
5. Certifique-se de que o sêmen diluído e preservado esteja completamente misturado durante todo o processo de alocação, para garantir que todos os frascos contenham concentrações de espermatozoides semelhantes. Mesmo pequenos atrasos após a mistura podem permitir que os espermatozoides comecem a se assentar, alterando a concentração nas alíquotas. Uma maneira de garantir a mistura constante é colocar o tubo de centrifuga com o sêmen diluído em uma prateleira e, depois, misturar o sêmen continuamente com uma mão, usando uma pipeta de transferência de plástico, enquanto remove as alíquotas usando uma pipeta na outra mão.
6. Dependendo das necessidades do laboratório, cada frasco deve conter 0,5-1,0 ml. Armazenar as amostras em alíquotas de 0,5 ml permite que várias contagens sejam feitas a partir de cada frasco.
7. Uma vez que a suspensão de esperma preservada tenha sido distribuída para todos os frascos, eles devem ser bem fechados. Dependendo do tipo de frasco utilizado, a tampa pode ser selada com uma tira de filme de laboratório autovedante. Isso não é necessário se criotubos forem usados.
8. Repetir todo o processo para as amostras de sêmen restantes.
9. Guardar os frascos a 4 °C.

Nota: A concentração das soluções IQC deve ser determinada depois que as diluições tenham sido preparadas e não deve ser assumida a partir da concentração original de sêmen. Uma vez preparadas as suspensões de espermatozoides preservadas, um frasco pode ser removido conforme necessário e avaliado (ver Seções 2.7 e 2.8). Os resultados podem ser cartografados usando o procedimento descrito na Seção 7.7. Todas as contagens devem ser feitas usando o método de contagem normalmente usado no laboratório. A seção abaixo descreve o procedimento usando o hemocitômetro.

A7.6.5 Usando as amostras IQC armazenadas

- As soluções preservadas devem ser ainda mais diluídas antes da contagem; a diluição dependerá do conservante utilizado.

- A diluição inicial do sêmen com formalina e azida é mínima, portanto, não precisa ser levada em consideração. O sêmen preservado na APSIS é inicialmente diluído em dobro (ou seja, 1 + 1 (1: 2)) e isso deve ser levado em consideração no cálculo final da concentração.
- Para suspensões diluídas em APSIS a partir de sêmen com uma concentração inicial superior a 25×10^6 por ml, a contagem é mais bem realizada utilizando uma diluição adicional de 1 + 9 (1: 10). Isto pode ser obtido adicionando 50 µl de suspensão de esperma preservado a 450 µl de água purificada. Isso produz uma diluição final no sêmen de 1: 20. Não use o APSIS como diluente, porque isso interferirá com os espermatozoides sedimentados na grade do hemocitômetro.
- Para as etapas a seguir, todas as pipetas devem ser pré-ajustadas no volume apropriado e pré-carregadas com uma ponta limpa para remoção rápida da alíquota imediatamente após a mistura.
- Um frasco de diluição deve ser preparado com o volume apropriado de água (ou seja, 450 µl se for feita uma diluição 1: 10 como sugerido acima). O conteúdo do frasco de armazenamento de sêmen deve ser bem misturado em um misturador de vórtice por aproximadamente 30 segundos na velocidade máxima. Uma alíquota de 50 µl deve então ser transferida para o frasco de diluição contendo água. O frasco de diluição deve então ser agitado durante 20 segundos à velocidade máxima. O hemocitômetro deve ser carregado com 10 µl de suspensão e os espermatozoides devem ser contados conforme descrito nas Seções 2.8.2 e 2.8.3.
- Se a amostra de sêmen original usada para preparar o sêmen preservado tiver uma baixa concentração de espermatozoides, a diluição para a contagem precisará ser ajustada de acordo com isso. Por exemplo, se a concentração original de sêmen estava na faixa de 4 a 25×10^6 por ml, para criar uma diluição final de 1: 5, como no laboratório, a diluição adicional apropriada de sêmen preservado com APSIS seria de 2: 5 (2 + 3: já que o sêmen já foi diluído 1 + 1 (1: 2) com APSIS). Isto pode ser conseguido diluindo 50 µl do sêmen conservado com 75 µl de água purificada.
- As suspensões de esperma conservadas e armazenadas no refrigerador devem permanecer estáveis por pelo menos 4 meses, quando novas soluções devem ser preparadas. É desejável ter um período de sobreposição, durante o qual as preparações antigas e novas são executadas, para monitorar o período de transição.

A7.7 Preparação de lâminas para controle de qualidade interno de avaliação da morfologia espermática

A7.7.1 Considerações gerais

- Os esfregaços podem ser preparados no laboratório para uso no controle de qualidade interno de coloração e análise de morfologia.
- Múltiplos esfregaços podem ser preparados a partir de cada uma das várias amostras diferentes de sêmen, representando a faixa de morfologia registrada no laboratório.
- Os esfregaços podem ser fixados e armazenados para uso posterior no monitoramento dos procedimentos de coloração e análise.
- Esfregaços corados podem ser usados individualmente, ou em réplica, para QC do procedimento de análise morfológica.
- O uso de réplicas permite que a precisão intratécnica seja determinada. Estas lâminas de QC também são úteis quando se comparam resultados

de diferentes técnicos dentro de um laboratório ou quando se comparam análises entre laboratórios.

- Esfregaços montados e corados com Papanicolaou, armazenadas no escuro à temperatura ambiente, devem permanecer estáveis por muitos meses ou mesmo anos.
- O sêmen deve ser bem misturado durante todo o processo de preparação do esfregaço, para garantir que todos os esfregaços preparados a partir de uma amostra específica de sêmen sejam idênticos. Qualquer variação importante detectada durante a análise pode ser presumida como resultado do processo que está sendo monitorado (isto é, o procedimento de análise morfológica) e não causada pela mistura inadequada do sêmen durante a preparação da lâmina.

A7.7.2 Procedimento

1. Transferir o sêmen do recipiente da amostra para um tubo de centrifuga de 15 ml. Isso permitirá uma mistura mais fácil e completa durante o processo de preparação da lâmina.
2. Limpar as duas superfícies das lâminas de vidro fosco, esfregando vigorosamente com lenços de papel sem fiapos.
3. Etiquetar as lâminas foscas com informações de identificação (por exemplo, número de identificação e data) usando um lápis de mina HB (número 2). Marcas de lápis são estáveis através do processo de fixação e coloração com Papanicolaou das lâminas; marcas de tinta de canetas e alguns marcadores permanentes não o são.
4. Anexar uma ponta limpa à pipeta e ajustar o volume para 10 µl (ou o volume rotineiramente usado no laboratório para a preparação de esfregaços morfológicos).
5. O sêmen deve ser cuidadosamente misturado durante todo o processo, para garantir que todos os esfregaços sejam tão semelhantes quanto possível. Após a mistura, mesmo pequenos atrasos antes de remover a alíquota podem permitir que o esperma comece a se assentar, alterando a população de espermatozoides na lâmina.
6. Misturar bem a amostra no tubo de centrifuga, aspirando-a 10 vezes numa pipeta de fundo largo (aproximadamente 1,5 mm de diâmetro) equilibrada com a temperatura da amostra. Este processo deve ser vigoroso o suficiente para misturar o sêmen, mas não tão vigoroso que crie bolhas.
7. Imediatamente após a mistura, sem deixar tempo para os espermatozoides se assentarem na suspensão, colocar 10 µl de sêmen na extremidade transparente de uma das lâminas limpas. É importante não deixar a gota de sêmen permanecer na lâmina por mais de alguns segundos antes de esfregar.

8. Corar a alíquota de sêmen sobre a superfície da lâmina usando a técnica de difusão (consulte a Seção 2.13.2). Neste procedimento, a borda de uma segunda lâmina é usada para arrastar a gota de sêmen ao longo da superfície da lâmina. Certifique-se de usar a lâmina para "puxar" o sêmen sobre a lâmina: não usar a lâmina para "empurrar" o sêmen por trás. Deve-se tomar cuidado para não deixar os esfregaços muito grossos ou haverá espermatozoides superpostos ou aglutinados e mais manchas no fundo. A separação dos espermatozoides na lâmina depende do volume de sêmen e da concentração espermática, do ângulo de deslizamento (quanto menor o ângulo, mais fino o esfregaço) (Hotchkiss, 1945) e da velocidade de esfregação (quanto mais rápido o movimento, mais espessa a mancha) (Eliasson, 1971).
9. Repetir os passos 6 a 8 para as lâminas restantes, fazendo apenas uma lâmina após cada mistura para garantir que os espermatozoides não se fixem antes que a alíquota seja removida. Se houver uma pausa de mais de alguns segundos após a mistura, o sêmen deve ser misturado novamente antes que a alíquota seja removida.
10. Uma vez que a técnica é estabelecida e a preparação está indo bem, pode ser possível fazer duas ou três lâminas após cada mistura. Todas as alíquotas devem ser removidas imediatamente após a mistura e os dois ou três esfregaços devem ser feitos o mais rápido possível, em poucos segundos.

A7.8 Calibração de equipamentos

- Pipetas, câmaras de contagem e outros equipamentos devem ser calibrados em intervalos semestrais ou anuais.

A7.8.1 Balanças

- As balanças devem ser verificadas regularmente com calibradores internos e por calibração externa no momento do serviço regular de manutenção laboratorial.
- Calibrar as balanças com pesos padrão externos (por exemplo, 1, 2, 5 e 10 g para cobrir a faixa de pesos do sêmen).
- Repetir as medições 10 vezes e calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) ($= 100 \times \text{DP}/\text{média}$).
- Verificar a precisão (que o peso estipulado caia dentro de 2 DP da média medida).

A7.8.2 Pipetas

- Calibrar as pipetas aspirando água purificada até a marca de graduação e distribuindo-a para as bandejas de pesagem pré-pesadas.
- Calcular o volume previsto a partir do peso da água pipetada, assumindo uma densidade de 1 g/ml.

Nota: A densidade da água diminui com a temperatura (Lentner, 1981). É 0,9982 g/ml a 20 °C, 0,9956 g/ml a 30 °C e 0,9922 g/ml a 40 °C. Para fins de calibração, no entanto, um valor assumido de 1,0 g/ml é adequado.

- Repetir as medições 10 vezes e calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) ($= 100 \times \text{DP}/\text{média}$).
- Verificar a precisão (que o volume estipulado caia dentro de 2 DP da média medida).

A7.8.3 Profundidade das câmaras

- Medir a profundidade das câmaras de contagem usando a escala Vernier no foco fino de um microscópio. Concentre-se primeiro na grade da câmara e, em seguida, em uma marca de tinta na parte de baixo da lamínula. Medir o número de marcas de graduação entre os dois pontos.
- Repetir a medição 10 vezes e calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) ($= 100 \times \text{DP}/\text{média}$).
- Verificar a precisão (que a profundidade estipulada caia dentro de 2 DP da média medida).

A7.8.4 Incubadoras

- As temperaturas das incubadoras e das platinas aquecidas devem ser verificadas com termômetros que são, por sua vez, calibrados regularmente.
- As misturas de gás CO_2 devem ser verificadas diariamente com a leitura da incubadora, ou por outros sistemas analisadores de gás, semanalmente a mensalmente, e por amostragem de gás no momento da manutenção.

A7.8.5 Papel de pH

- Deve ser verificado em relação a padrões de pH conhecidos.

A7.8.6 Outros equipamentos

- Outros equipamentos e reagentes de laboratório, como medidores de pH, também devem ser verificados em intervalos de 3 a 6 meses.

Referências

- Armitage P et al. (2002). Statistical methods in medical research. Oxford, Blackwell Science.
- Brazil C et al. (2004). Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25: 645-656.
- Eliasson R (1971). Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3: 49-64.
- Hotchkiss RS (1945). Fertility in man. London, William Heineman Medical Books.
- Jørgensen N et al. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16: 1012-1019.
- Lentner C (1981). Geigy scientific tables. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basel, Ciba-Geigy.

APÊNDICE 8 Programas nacionais de controle de qualidade externa para análise de sêmen

Austrália: Sociedade de Fertilidade da Austrália, Esquemas Externos de Garantia de Qualidade para Medicina Reprodutiva, PO Box 1101, West Leederville, Western Australia 6901, Austrália

Dinamarca: Instituto Dinamarquês de Garantia Externa da Qualidade para Laboratórios de Saúde, DEKS 54MI, Herler Universitets sygehns, Herler Ringvej 75, 2730 Herlor, Dinamarca

Alemanha: QuaDeGA, Centro de Medicina Reprodutiva e Andrologia do Hospital Universitário de Münster, Domagkstrasse 11, D-48129 Münster, Alemanha

Itália: Avaliação Externa de Qualidade, Grupo Analítico de Controle de Qualidade, Hospital Universitário de Bolonha, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Itália

Escandinávia: NAFA (Associação Nórdica para a Andrologia), Unidade de Andrologia, Centro de Medicina Reprodutiva, Karolinska Hospital, PO Box 140, SE-171 76 Stockholm, Suécia

Espanha: Centro de Estudo e Pesquisa em Fertilidade (CEIFER), Granada, Espanha

Reino Unido: Esquemas UKNEQAS para Andrologia, Departamento de Medicina Reprodutiva, St Mary's Hospital, Manchester M13 0JH, Reino Unido

Estados Unidos: Associação Americana de Serviço de Teste de Proficiência de Bioanalistas, 205 West Levee, Brownsville, Texas 78520-5596, EUA

Brasil: Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ, Rua Vicente Licinio, 191 – 20.270-340 - Tijuca – Rio de Janeiro – RJ - Brasil

Este manual é oferecido como um recurso para cientistas, técnicos e gerentes que realizam análises de sêmen em laboratórios clínicos e de pesquisa. A quinta edição fornece protocolos detalhados, atualizados e baseados em evidências para ensaios rotineiros, opcionais e de pesquisa, com o objetivo de melhorar a qualidade, e a padronização, da análise de sêmen e melhorar a comparabilidade dos resultados de diferentes laboratórios.

Características da nova edição

- Um formato fácil de usar que inclui informações detalhadas sobre cada procedimento;
- Material adicional para explicar a metodologia e auxiliar na interpretação dos resultados;
- Várias micrografias detalhadas mostrando exemplos de várias anormalidades espermáticas;
- Seções sobre preparação de espermatozoides e criopreservação;
- Intervalos de referência baseados em evidências e limites de referência para várias características do sêmen.