

ESPERMOGRAMA

Cynthia Manzzi Feijó

Deborah Montagnini Spaine

Danielle S. Tibaldi

Sandro C. Esteves

INTRODUÇÃO

O espermograma é o foco central da avaliação laboratorial para o homem com queixa de infertilidade. Embora não seja um teste de função espermática, esse exame fornece informações sobre a atividade germinativa, a atividade dos epidídimos e a atividade das glândulas sexuais acessórias¹.

Os resultados do espermograma são frequentemente utilizados como marcadores da fecundidade masculina e das chances de se estabelecer uma gravidez. É de fundamental importância, portanto, que o exame seja executado por profissionais bem treinados e realizado num laboratório de andrologia com rigoroso controle de qualidade (Figura 1). A acurácia e a reprodutibilidade dos resultados fornecidos pelo laboratório facilitam ao clínico estabelecer a melhor linha diagnóstica e terapêutica². Apesar disso, o valor prognóstico das variáveis seminais, como concentração, motilidade e morfologia espermática, como marcadores de fecundidade é limitado. O potencial fértil do homem é influenciado pela atividade sexual, pelo estado das glândulas sexuais acessórias e por fatores definidos, como estado de saúde geral, uso de medicamentos, drogas ilícitas, tabagismo e álcool, além de outros desconhecidos.



Figura 1. Visão geral do laboratório de andrologia. O laboratório deve possuir equipamentos e instrumentos específicos e em quantidade necessária ao atendimento de sua demanda, manter manuais técnico-operacionais referentes aos equipamentos e procedimentos realizados facilmente acessíveis aos funcionários do setor, implementar e manter um programa de manutenção preventiva e corretiva, além de manter os equipamentos calibrados.

Os valores de referência para as variáveis rotineiramente analisadas no sêmen foram recentemente atualizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS)³. Na Tabela 1, encontram-se os valores de referência publicados em edições anteriores consecutivas dos manuais da OMS³⁻⁶. Embora esses valores sejam largamente utilizados para diferenciar

homens férteis e subfértéis, existe ampla variação de fertilidade mesmo nos homens com parâmetros anormais. Os valores de referência utilizados pelo manual da OMS publicado em 2010 foram estabelecidos com base em resultados de análises seminais de um grupo de aproximadamente dois mil homens de oito países, que foram capazes de engravidar suas parceiras por via natural até um ano após o término da contracepção⁷. Os valores dos parâmetros espermáticos desses homens foram distribuídos em uma curva, gerando valores médios e intervalos de confiança para diversos percentis. Estabeleceram-se como valores de referência aqueles obtidos no percentil 5, ou seja, 95% dos indivíduos considerados “férteis” possuíam análises seminais cujos parâmetros espermáticos eram maiores ou iguais aos observados nesse percentil (Tabela 1)^{3,7}.

Os valores de referência indicados no novo manual da OMS não devem, portanto, ser utilizados para uma distinção rígida entre homens férteis e inférteis, embora sirvam como um guia padronizado para auxiliar na avaliação das chances de concepção⁸. Valores abaixo dos limites estabelecidos podem sugerir a necessidade de tratamento, embora não tenham poder discriminatório para determinar a natureza desse tratamento. Entre os parâmetros espermáticos, nenhum deles foi capaz de, isoladamente, distinguir entre os grupos de homens que obtiveram gravidez daqueles que não o fizeram, embora a morfologia espermática tenha sido o parâmetro mais representativo. Os resultados da análise seminal de um paciente devem ser interpretados em conjunto com as informações clínicas^{2,8}.

COLETA DO SÊMEN

O local de coleta tem efeito direto sobre os parâmetros seminais, especialmente sobre o volume ejaculado. Preferencialmente, a amostra seminal deve ser colhida em uma sala silenciosa, isolada, limpa, com banheiro anexo e próxima ao laboratório onde será realizada a análise (Figura 2). A coleta domiciliar pode ser autorizada em casos especiais, desde que o material chegue ao laboratório em no máximo uma hora e que cuidados sejam tomados durante seu transporte até o laboratório⁹. Os parâmetros seminais são influenciados por temperaturas abaixo de 25 °C ou acima de 37 °C. Quando isso ocorrer, os resultados obtidos podem não ser confiáveis.

O modo preferencial de coleta é a masturbação. A coleta por coito interrompido não é indicada, pois pode haver perda da primeira fração do ejaculado ou contaminação da flora vaginal. Em casos selecionados, pode-se autorizar a coleta pelo ato sexual utilizando preservativo atóxico (ex.: *Male-Factor Pak*[®]). Nos portadores de lesão medular, a coleta pode ser realizada por vibroestimulação ou por eletroejaculação. Nos casos de ejaculação retrógrada, o paciente deve ser orientado quanto à alcalinização prévia da urina obtida pela ingestão oral de bicarbonato de sódio.

O sêmen deve ser colhido utilizando-se um frasco estéril, descartável, composto de polipropileno, de boca larga (cerca de sete centímetros de diâmetro) e com tampa de rosca. O laboratório sempre deve fornecer o frasco coletor, cujo lote é previamente testado quanto à toxicidade do plástico sobre a motilidade espermática (Figura 3).

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros seminais publicados nos consecutivos manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS)

Parâmetros seminais	Edição (Ano de publicação)				
	1ª (1980)	2ª (1987)	3ª (1992)	4ª (1999)	5ª (2010) ¹
Volume (mL)	--	≥ 2,0	≥ 2,0	≥ 2,0	≥ 1,5
Concentração (x10 ⁶ por mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15
Concentração total (x10 ⁶)	--	≥ 40	≥ 40	≥ 40	39
Motilidade total (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	40
Motilidade progressiva ²	≥ 2 ³	≥ 25%	≥ 25% (grau a)	≥ 25% (grau a)	32% (a+b)
Vitalidade (% vivos)	--	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58
Morfologia (% normais)	80,5	≥ 50	≥ 30 ⁴	≥ 14 ⁵	4 ⁶
Leucócitos (x10 ⁶ por mL)	< 4,7	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

¹ Valores de referência correspondentes ao percentil 5, obtidos pela distribuição dos dados dos espermogramas de homens que engravidaram suas esposas num intervalo ≤ 12 meses; ² grau a = motilidade progressiva rápida (> 25 µm por s); grau b = motilidade progressiva lenta (5 a 25 µm por s); ³ progressão para frente (escala 0 a 3); ⁴ valor arbitrário; ⁵ valor não definido, porém sugerido levando-se em consideração o critério estrito; ⁶ critério estrito de Tygerberg. (Adaptado de Esteves SC *et al.* Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology*. 2012;79(1):16-22.)



Figura 2. Visão geral da sala utilizada para coleta de sêmen. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº 23 da Anvisa, a sala de coleta de sêmen deve garantir o conforto e a privacidade do paciente e possuir um sanitário com acesso exclusivo.



Figura 3. Frasco coletor comumente utilizado para a coleta de sêmen. O frasco deve ser estéril, de boca larga e testado quanto à toxicidade do plástico para a motilidade espermática.

Os parâmetros espermáticos avaliados rotineiramente são influenciados pelo tempo de abstinência ejacutória antes da coleta, pelo método de coleta, pela temperatura e pelo tempo entre a ejaculação e o início da análise. Em razão da variabilidade biológica entre espermogramas de um mesmo paciente, pelo menos dois exames devem ser realizados antes de se estabelecer alguma conclusão diagnóstica². O intervalo recomendado entre os exames é arbitrário, e geralmente se situa entre 7 e 15 dias. O tempo de abstinência ejacutória antes da coleta deve ser de dois a sete dias³.

ANÁLISE SEMINAL

O espermograma de rotina deve abranger: (a) características físicas do sêmen, que incluem coagulação, liquefação, viscosidade, aspecto, cor e pH; (b) volume da amostra;

(c) avaliação microscópica, que inclui a concentração de espermatozoides, motilidade espermática total e progressiva, vitalidade espermática, morfologia espermática e quantificação do número de leucócitos.

Avaliação macroscópica das características físicas do sêmen

Imediatamente após a ejaculação, o sêmen normal forma um coágulo semelhante a um gel, em razão da presença de proteínas secretadas pelas vesículas seminais (semenogelina, fibronectina e lactoferrina). A ausência de coagulação indica a inexistência ou a deficiência das proteínas que formam o coágulo e pode ocorrer nos casos de obstrução dos dutos ejaculatórios, ausência congênita ou disfunção das vesículas seminais.

A liquefação do coágulo seminal é um processo enzimático e a principal enzima envolvida é o antígeno prostático específico (PSA). Depois da observação da presença ou não do coágulo, o frasco com a amostra seminal pode ser colocado em uma estufa, à temperatura de 37 °C, ou permanecer à temperatura ambiente, para que ocorra a liquefação. O tempo médio para a liquefação completa é de 15 a 30 minutos. Caso ela não ocorra em até 60 minutos, classifica-se a liquefação como “incompleta”, podendo ter ocorrido alterações prostáticas. Amostras normalmente liquefeitas podem conter corpúsculos gelatinosos que não se dissolvem; estes não apresentam nenhum significado clínico.

A viscosidade do sêmen deve ser avaliada após a liquefação, com o auxílio de uma pipeta sorológica de 5 ml. A viscosidade é considerada normal quando a amostra, ao sair da pipeta por ação somente da força da gravidade, goteja ou forma um filamento com extensão inferior a 2 cm. Quando o filamento formado for superior a 2 cm, a viscosidade é descrita como aumentada.

O aspecto do sêmen é modificado à medida que os processos de coagulação e liquefação acontecem. Imediatamente após a coleta, a amostra seminal tem aspecto heterogêneo, espesso e gelatinoso, tornando-se opalescente, homogêneo e mais fluido após a liquefação.

As colorações branca ou acinzentada são consideradas normais. Alteração na cor pode indicar doenças locais ou sistêmicas (infecção, hepatite) ou ainda uso de medicamentos (antibióticos, antissépticos urinários ou vitaminas). A coloração avermelhada, em razão da presença de hemácias, é conhecida por hematospermia e pode resul-

tar de um processo inflamatório, obstrução ou cistos nos dutos ejaculatórios, neoplasias, anormalidades vasculares, entre outros⁹.

O pH seminal é resultado da mistura das secreções das vesículas seminais (pH alcalino) e da próstata (pH ácido). O valor normal do pH seminal é $\geq 7,2$. Após a colheita, o frasco com a amostra seminal deve permanecer bem fechado para evitar evaporação do CO_2 da amostra e alteração do sistema tampão. A determinação do pH é rotineiramente realizada utilizando-se papel de indicador de pH.

Volume

O volume seminal depende primariamente das glândulas sexuais acessórias, sendo aproximadamente 60% proveniente das vesículas seminais, 30% da próstata, 5% de secreções do epidídimo, glândulas de Cowper e de Littré, e 5% de elementos figurados (espermatozoides, células germinativas, leucócitos etc.).

De acordo com a mais recente versão do manual da OMS³, o volume seminal deve ser avaliado pela sua densidade. Assim, o frasco coletor é pesado antes e depois da coleta. Sabendo-se que a densidade do sêmen é de 1 g por ml, calcula-se o volume pela diferença entre as pesagens. Para simplificar, o volume seminal pode ser medido com auxílio de uma pipeta sorológica graduada de 5 ml, com intervalo de 0,1 ml, aspirando-se toda amostra colhida após a liquefação.

A diminuição do volume seminal (hipospermia) pode estar relacionada à obstrução dos dutos ejaculatórios ou ausência congênita das vesículas seminais, obstrução das vesículas seminais, à ejaculação retrógrada, à disfunção das glândulas sexuais acessórias e ao hipogonadismo^{1,2}. Outros fatores, tais como perda de parte da amostra durante a coleta, ejaculação parcial em razão de orgasmo incompleto, período de abstinência inadequado e estresse, também podem diminuir o volume do ejaculado colhido.

Avaliação microscópica das características do sêmen

Agregação e aglutinação

Após a análise macroscópica, realiza-se a avaliação microscópica inicial quanto à presença de agregação e de aglutinação. Para isso, 20 μL do sêmen liquefeito são colocados sobre uma lâmina de microscopia e recobertos com lamínula. Avalia-se a alíquota sob microscopia óptica com contraste de fase utilizando magnificação de quatrocentas

vezes. Existem dois tipos de aglutinação: (i) inespecífica (também conhecida como agregação, em que se observam espermatozoides imóveis aderidos a células ou *debris* celulares); (ii) específica (espermatozoides aderidos uns aos outros). Esta última é sugestiva da presença de anticorpos antiespermatozoides¹⁰.

Motilidade espermática

A motilidade é definida como o movimento espontâneo dos espermatozoides. A determinação do percentual de espermatozoides móveis e sua progressão é realizada manualmente ou por meio da utilização de sistemas computadorizados. Na avaliação manual, uma alíquota do sêmen liquefeito é avaliada sob microscopia óptica, com contraste de fase, utilizando-se aumento de duzentas ou quatrocentas vezes, e, preferencialmente, sob condições controladas de temperatura, a 37 °C (placa aquecedora acoplada ao microscópio).

Os espermatozoides podem ser classificados de acordo com três padrões de motilidade (OMS, 2010), a saber:

- motilidade progressiva;
- motilidade não progressiva;
- imóveis.

Idealmente, a avaliação da motilidade espermática deve ser realizada com a utilização de câmaras apropriadas, que possuem profundidade conhecida (ex.: Makler[®], Horwell[®], Microcell[®]) e permitem a livre movimentação dos espermatozoides (Figura 4). Pelo menos duzentas células são avaliadas, e o cálculo final é expresso em termos percentuais. De maneira alternativa, pode-se avaliar a motilidade com o uso de lâmina e lamínula. Para tanto, deposita-se cerca de 10 μL de sêmen liquefeito sobre lâmina de microscopia, aquecida a 37 °C, e cobre-se com lamínula. Inicialmente, contam-se os espermatozoides que exibem motilidade progressiva em um campo aleatório. A seguir, contam-se os que exibem motilidade não progressiva, bem como os imóveis, no mesmo campo visual. O processo é realizado em duplicata e, ao final, a média é utilizada para estabelecer o percentual de espermatozoides móveis (motilidade total) e daqueles com motilidade progressiva.

Concentração espermática

A concentração espermática é definida como o número de espermatozoides em milhões por mililitro de sêmen ($\times 10^6$ por ml), devendo ser determinada pela diluição volumétrica associada à hematocitometria. A contagem dos espermatozoides deve ser realizada por meio de uma câmara de Neubauer modificada, que apresenta, na verdade, duas câmaras,

uma superior e outra inferior. Cada uma possui 0,100 mm de profundidade e um retículo central contendo 25 quadrados grandes, cada um com 16 quadrados menores (Figura 5).

Para se determinar a concentração espermática, conta-se o número de espermatozoides presentes nos 25 quadrados grandes (cinco fileiras) de ambas as câmaras, obtendo-se a média entre as duas contagens. Utiliza-se microscopia óptica comum com magnificação de duzentas vezes para a observação dos espermatozoides. Para que os resultados sejam validados, a diferença entre as contagens das duas câmaras não deve exceder 1/20 da sua soma. Caso isso ocorra, é necessário homogeneizar novamente a diluição e repetir o procedimento.

A concentração de espermatozoides em milhões por mililitro é resultante da média daqueles contados pelo fator de diluição da câmara (Tabela 2).

A contagem total (do ejaculado) é obtida multiplicando-se o valor da concentração de espermatozoides pelo volume da amostra seminal, e o resultado é expresso em milhões de espermatozoides por ejaculado.

Morfologia espermática

A morfologia é definida pela forma e pelo aspecto dos espermatozoides. Entre os vários sistemas de classificação morfológica, o recomendado pelo manual da OMS³ é o critério estrito de Tygerberg, descrito em 1986 por Kruger *et al.*, que emprega a análise morfométrica para a determinação do padrão de normalidade: segmento cefálico com forma oval e lisa (possuindo de 5 µm a 6 µm de comprimento e de 2,5 µm a 3,5 µm de largura, quando corados pela coloração do Diff-Quick[®] ou panóptico), com acrosomo compreendendo de 40% a 70% do segmento cefálico. A peça intermediária deve ser delgada, com menos de 1 µm de largura, comprimento aproximado de 1,5 vez o tamanho do segmento cefálico e não apresentar nenhum defeito. A cauda deve ser uniforme, levemente mais fina que a peça intermediária, com comprimento aproximado de 45 µm, sem defeito, como cauda enrolada, quebrada ou curta. Pelo critério de Kruger, as formas limítrofes são consideradas anormais (Figura 6).



Figura 4. Câmaras de contagem utilizadas para análise da motilidade espermática: (a) câmara de Makler; (b) Microcell; (c) Horwell.

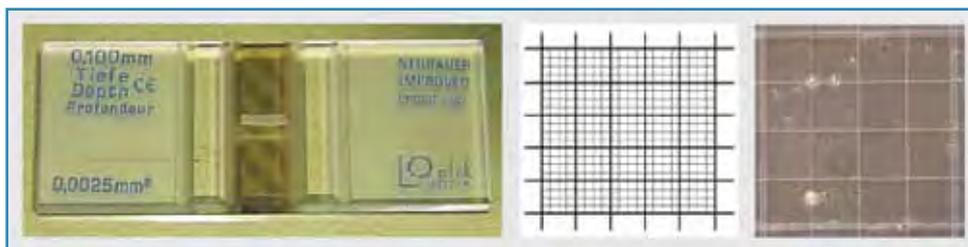


Figura 5. Câmara de Neubauer modificada (à esquerda). No centro, ilustração representando seu retículo central, que contém 25 quadrados subdivididos em 16 quadrados menores. À direita, fotomicrografia mostrando um dos 25 quadrados do retículo central da câmara, delimitado por linhas triplas e contendo 16 quadrados menores, nos quais se observam os espermatozoides.

Tabela 2. Diluições e fatores de correção para determinação da concentração de espermatozoides, utilizando hematocitometria (adaptado do manual da Organização Mundial da Saúde para o exame e processamento de sêmen humano, 5ª. Ed., 2010 p. 39)

Número de espermatozoides por campo inteiro (exame a fresco; 200x)	Diluição	Volume sêmen (µl)	Volume fixador (diluyente) (µl)	Fator de diluição
> 400	1:20 (1+19)	50	950	5
61 a 400	1:5 (1+4)	50	200	20
1 a 60	1:2 (1+1)	50	50	50

A análise da morfologia é realizada preparando-se um esfregaço com 5 µl de sêmen liquefeito. A lâmina de microscopia utilizada para a confecção do esfregaço deve ser previamente limpa com álcool 70%, e, após a fixação e coloração (Figura 7), no mínimo duzentos espermatozoides são contados e classificados como normais e anormais.

Para a análise morfométrica, avaliam-se as dimensões e o aspecto dos espermatozoides sob magnificação de mil vezes (imersão), com o auxílio de um micrômetro acoplado à ocular do microscópio óptico. O resultado é expresso em porcentagem de formas ovais normais (Figura 8).

Em relação às formas anormais, recomenda-se calcular o percentual de espermatozoides exibindo defeitos no segmento cefálico, na peça intermediária e na cauda, bem como aqueles com excesso de citoplasma residual (Figuras 9, 10 e 11)³.

Vitalidade espermática

O teste rotineiramente empregado para a avaliação da vitalidade espermática utiliza o corante supravital eosina. Espermatozoides vivos apresentam membrana plasmática íntegra e não permitem a passagem da eosina para o interior da célula (espermatozoide não corado). O mesmo não ocorre com espermatozoides mortos, cujas membranas não estão intactas (espermatozoide corado de rosa). Pelo menos duzentos espermatozoides são avaliados utilizando-se microscopia óptica com objetiva de imersão (magnificação de mil vezes) (Figura 12).

De acordo com o manual da OMS³, a determinação da vitalidade espermática deve ser realizada apenas quan-

do a porcentagem de espermatozoides imóveis for superior a 60%.

Concentração de células redondas e leucócitos

Normalmente, a amostra seminal possui outros elementos celulares além dos espermatozoides, como células epiteliais do trato geniturinário, células prostáticas superficiais ou colunares, células germinativas imaturas – como espermatócitos e espermátides –, além de leucócitos. A determinação da concentração desse grupo de células referidas como “redondas” é realizada empregando-se a mesma metodologia descrita para a determinação da concentração de espermatozoides.

Do ponto de vista clínico, entretanto, o mais importante é diferenciar os leucócitos das outras células redondas, pois a ocorrência de um número elevado de leucócitos no sêmen pode indicar infecção genital clínica ou subclínica, níveis elevados de radicais livres de oxigênio, títulos elevados de anticorpos antiespermatozoides, função espermática deficiente e, conseqüentemente, diminuir a fertilidade^{2,9}. Entre as diversas técnicas existentes para a identificação dos leucócitos no sêmen, a mais simples é o teste de Endtz, ou teste da peroxidase. Esse teste permite identificar os neutrófilos polimorfonucleares, que são os de maior importância clínica e geralmente provêm do epidídimo. Os neutrófilos também são chamados de granulócitos, pois possuem grânulos contendo uma enzima chamada peroxidase.

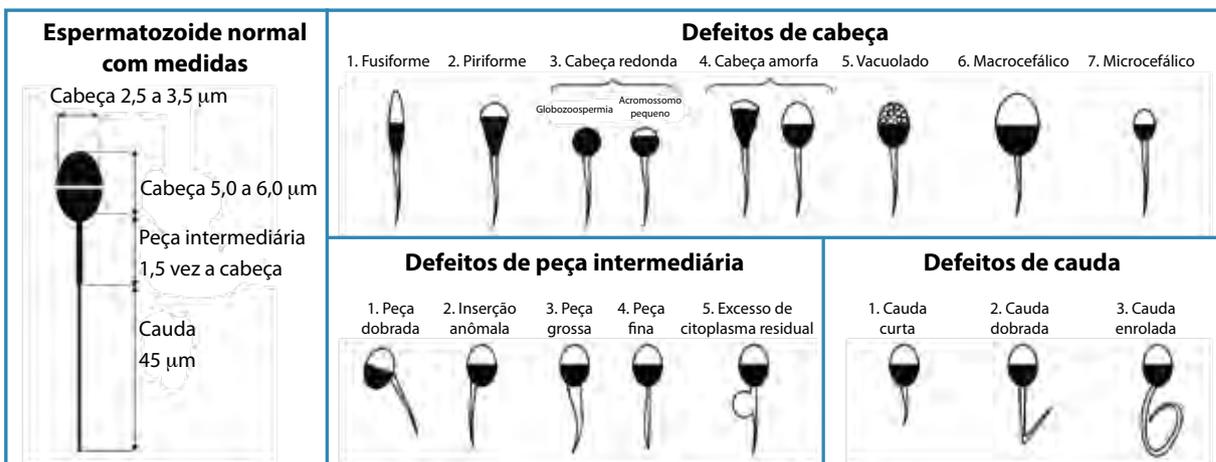


Figura 6. Desenho esquemático do espermatozoide humano visto à microscopia óptica, com as medidas utilizadas na avaliação morfométrica, segundo o critério estrito de Tygerberg (quadro à esquerda). No centro e à direita, ilustrações representando os defeitos morfológicos mais comuns.



Figura 7. Coloração pelo método panótico da morfologia espermática. Inicialmente, mergulha-se a lâmina de microscopia com o esfregaço de sêmen (seco) na solução fixadora. O processo é repetido cinco vezes, mantendo-se o esfregaço por um segundo dentro da solução, com intervalo de um segundo entre os mergulhos. É necessário deixar a lâmina secar completamente antes de prosseguir para o próximo passo (aproximadamente 15 minutos). Depois, mergulha-se a lâmina seca na solução I do *kit* panótico, seguindo-se o mesmo método descrito para a etapa anterior. Deve-se permitir que o excesso do corante escorra, mas a lâmina não deve secar completamente. A última etapa consiste em mergulhar a lâmina na solução II do *kit* panótico, processo que deve ser repetido duas vezes, seguindo-se a mesma sistemática já descrita. O excesso do corante é removido enxaguando-se a lâmina gentilmente em água destilada, e finalmente se deixa a lâmina secar por completo à temperatura ambiente antes de realizar a leitura.

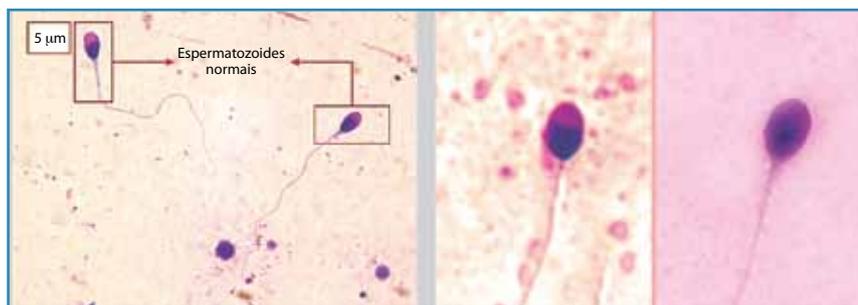


Figura 8. Fotomicrografias de espermatozoides normais corados pelo método panótico. Os espermatozoides foram avaliados pelo critério estrito de Tygerberg (Kruger). As setas indicam a visão geral de espermatozoides normais (esquerda). À direita, detalhes da cabeça e da peça intermediária de espermatozoides normais.

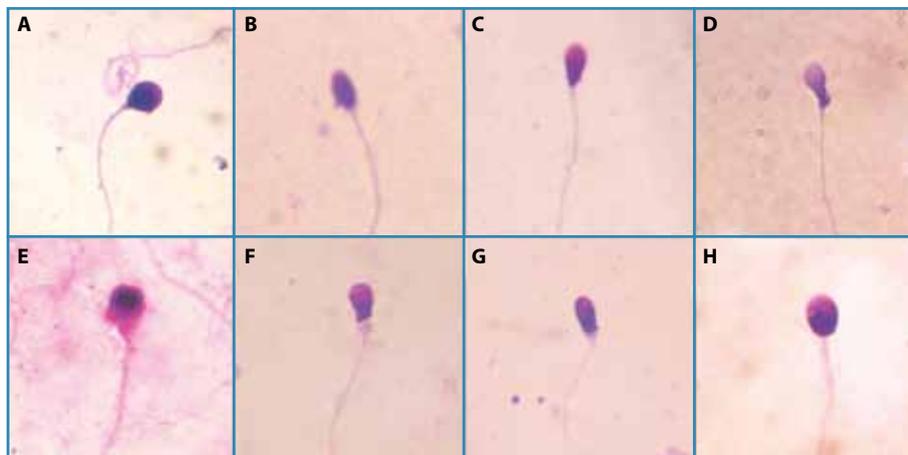


Figura 9. Fotomicrografias de espermatozoides apresentando defeitos morfológicos na cabeça: (A) macrocefálico; (B) microcefálico; (C) fusiforme; (D) piriforme; (E) redondo; (F) e (G) amorfo; (H) vacuolado (com mais de dois vacúolos ou mais de 20% da área da cabeça ocupada por vacúolos). Os esfregaços foram corados pelo método panótico, e os espermatozoides foram avaliados pelo critério estrito de Tygerberg (Kruger).

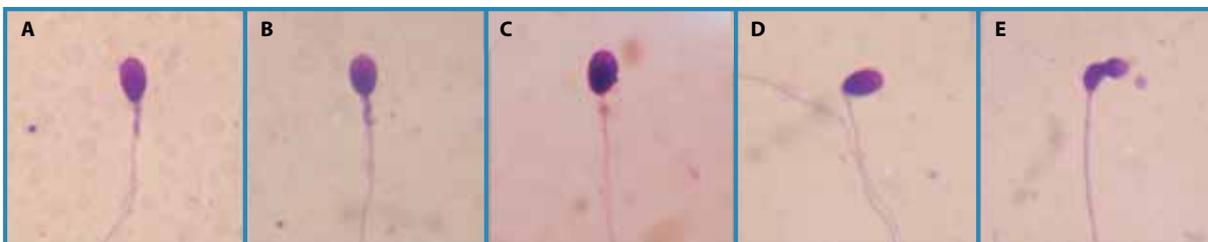


Figura 10. Fotomicrografia de espermatozoides apresentando defeitos morfológicos na peça intermediária: (A) inserção anômala da peça; (B) peça espessa; (C) peça fina; (D) peça dobrada; (E) com excesso de citoplasma residual (1/3 ou mais em relação ao tamanho da cabeça; esse defeito normalmente vem acompanhado de outros defeitos na peça intermediária. Gotas citoplasmáticas são vesículas pequenas aderidas à peça intermediária e representam elementos normais de espermatozoides funcionais; normalmente, se perdem durante o processo de coloração ou aparecem como distensões da peça intermediária com tamanho inferior a 1/3 da cabeça). Os esfregaços foram corados pelo método panótico, e os espermatozoides foram avaliados pelo critério estrito de Tygerberg (Kruger).

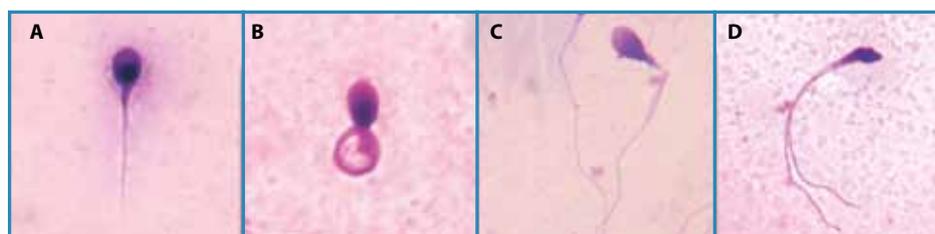


Figura 11. Fotomicrografia de espermatozoides apresentando defeitos na cauda: (A) cauda curta; (B) cauda enrolada; (C) cauda dobrada; (D) cauda dupla. Os esfregaços foram corados pelo método panótico, e os espermatozoides foram avaliados pelo critério estrito de Tygerberg (Kruger).



Figura 12. Avaliação da vitalidade espermática pelo método da eosina. Espermatozoides com a cabeça corada em rosa são considerados “mortos” (membrana plasmática não intacta, que permite a entrada do corante supravital), e os não corados (cabeça branca) são considerados “vivos”, pois possuem a membrana íntegra, que não permite a entrada do corante.

Nesse teste, uma alíquota de sêmen liquefeito é incubada com um reagente contendo água oxigenada, que reage com a peroxidase presente nos grânulos dos neutrófilos. A peroxidase pertence ao grupo de enzimas com capacidade de oxidar substratos orgânicos, usando o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons na reação. Como resultado, obtém-se uma reação colorimétrica: os neutrófilos coram-se de marrom e são facilmente identificados à microscopia óptica, ao passo que as células peroxidase ne-

gativas não se coram (Figura 13). Estas últimas podem representar células germinativas imaturas ou outros tipos de leucócitos, como os monócitos, os linfócitos e os macrófagos. Depois do ensaio, pelo menos duzentas células são analisadas, e o resultado é expresso em porcentagem de células peroxidase positivas. A concentração de neutrófilos é calculada multiplicando-se a concentração de células redondas ($\times 10^6$ por ml) pela porcentagem de neutrófilos (células peroxidase positivas).

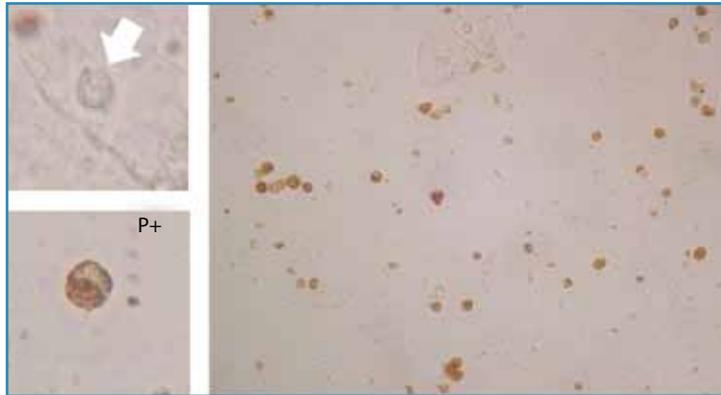


Figura 13. Diferenciação das células redondas presentes no sêmen, utilizando o teste de Endtz. À esquerda: célula redonda peroxidase negativa (seta larga) e granulócito peroxidase-positivo (P+). À direita: visão geral de uma lâmina contendo vários granulócitos peroxidase-positivos.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem Fausto Barbieri e sua equipe pela criação das ilustrações.

REFERÊNCIAS

1. Esteves SC. Infertilidade masculina. In: Rhoden, EL ed. Urologia no consultório. Porto Alegre: Artmed; 2009, p. 470-80.
2. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics (São Paulo)*. 2011; 66(4):691-700.
3. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva, WHO press, 2010, 287 p.
4. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1987, 80 p.
5. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1992, 107 p.
6. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1999, 128 p.
7. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
8. Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Critical appraisal of world health organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology*. 2012;79(1):16-22.
9. Esteves SC. Espermograma e correlações clínicas. In: Neves, PA & Rodrigues Netto, N. Jr: Infertilidade masculina. Editora Atheneu; São Paulo, Brasil: 2003, p. 59-70.
10. Esteves SC, Schneider DT, Verza S Jr. Influence of antisperm antibodies in the semen on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Int Braz J Urol*. 2007;33(6):795-802.