

Andrología

O espermograma na prática laboratorial

Semen analysis in laboratory practice

Ilda Pires

Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE.

Resumo

A análise do esperma é a investigação laboratorial mais importante na avaliação masculina do casal infértil. Os avanços ocorridos nas técnicas de fertilização in vitro (FIV), e em especial da microinjecção intracitoplasmática do espermatozóide directamente no ovócito (ICSI) não diminuíram a importância da análise do esperma na prática reprodutiva moderna. Os procedimentos padrão da análise do esperma incluem a avaliação do volume, aparência, viscosidade, concentração, mobilidade, morfologia, vitalidade assim como a determinação de células redondas, leucócitos e de anticorpos anti-espermatozóides. A análise de marcadores bioquímicos é opcional. Uma vez que os resultados são usados pelos clínicos para escolher opções apropriadas do tratamento, é imperativo um serviço de confiança. É crucial que o laboratório esteja habilitado a realizar a análise do esperma para assegurar um resultado exacto. Esta análise deve ser efectuada de acordo com o manual do laboratório da Organização Mundial de Saúde para a análise do esperma (1999), que descreve claramente as variáveis que precisam de ser avaliadas e os métodos da garantia de análise e de qualidade a ser usados. Estas directrizes da OMS (1999) estão actualmente em revisão.

Palavras-chave: investigação da infertilidade masculina, análise do esperma

Correspondência: Ilda Pires.

Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE. Unidade II.

Rua Dr. Francisco Sá Carneiro.

4400-129 Vila Nova de Gaia.

Portugal.

Correio electrónico: imspires75@gmail.com

Summary

Semen analysis is the most important laboratory investigation for men when assessing the infertile couple. Advances in in vitro fertilization (IVF) techniques, particularly intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) involving the direct injection of a single spermatozoon into an egg, have not diminished the role of semen analysis in modern reproductive practice. Standard procedures of semen analysis include evaluation of volume, appearance, viscosity, sperm concentration, motility, morphology, and vitality as well as determination of round cells, leukocytes, and sperm antibodies. Analysis of biochemical markers is optional. Since the results are used by clinicians to choose appropriate treatment options, a reliable service is imperative. It is crucial that the laboratory is experienced in the performance of semen analyses to ensure an accurate result. This analysis should be done according to World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen (1999), which clearly describes the variables that need to be assessed and the methods of analysis and quality assurance to be used. These WHO guidelines (1999) are currently under revision.

Key-words: male infertility investigation, semen analysis

INTRODUÇÃO

À escala europeia, estima-se que aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva apresentam dificuldade em engravidar após um ano de relações sexuais desprotegidas, sendo que um em cada quatro casais com mais de trinta e cinco anos seja infértil. Uma vez que aproximadamente metade destes casais tem algum grau de infertilidade masculina, a avaliação do homem e da mulher deve ser realizada em paralelo.

A infertilidade masculina pode dever-se a uma variedade de condições que devem ser avaliadas e, sempre que possível, tratadas por um andrologista. Conforme sublinhado pela Sociedade Americana de Medicina da Reprodução (1) os objectivos da avaliação da infertilidade masculina são (i) potencialmente corrigir condições de infertilidade; (ii) tratar condições que podem conduzir a infertilidade e que requeiram tratamento médico; (iii) identificar condições irreversíveis que podem ser resolvidas por técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA) usando esperma do parceiro masculino; (iv) identificar anomalias genéticas que possam afectar a saúde da descendência; (v) identificar condições irreversíveis para as quais não existem técnicas de RHA e para as quais as opções possíveis são o recurso a esperma de dador ou a adopção.

A avaliação do casal infértil inclui a história, exame físico e exames complementares de diagnóstico. No homem o exame mais importante na avaliação inicial é a análise do esperma, que dever ser logo pedido numa primeira consulta.

Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos

parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides. Acreditava-se que a análise seminal era o teste considerado padrão "ouro" para avaliar a capacidade fértil do homem; entretanto, pesquisas mostram que mais de 80% dos homens inférteis possuem concentrações espermáticas que excedem os valores de normalidade da Organização Mundial da Saúde (OMS). Desta forma, é necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade (2). A avaliação de fertilidade é um fenómeno complexo e multifactorial que envolve a avaliação do casal.

ESPERMOGRAMA

A análise dos parâmetros seminais providencia informação clínica importante sobre a espermatogénese e competência funcional dos espermatozoides, assim como sobre o padrão de secreção das glândulas sexuais acessórias.

Constituindo o passo básico na investigação de vários distúrbios que podem afectar o trato genital masculino, a análise do sêmen é particularmente útil na avaliação dos casais que requerem investigação da infertilidade, na confirmação de sucesso de vasectomia e vasovasostomia, previa e posteriormente à criopreservação de longa duração e na detecção de exposição de tóxicos que possam afectar o bom funcionamento do aparelho reprodutor masculino (3). Tem assim interesse substancial para o diagnóstico urológico, andrológico e ginecológico.

Se os resultados do espermograma forem normais justifica-se investir profundamente no estudo da mulher. Se, por outro lado os resultados são inconclusivos ou alterados, sugere-se que passados três meses

(tempo que decorre a espermatogénese) seja repetida a análise. Se se confirmar anomalia anterior o médico de família deverá enviar estes casos directamente para Andrologia/Urologia para estudos mais aprofundados (4).

O EJACULADO

O ejaculado é uma mistura de espermatozóides numa suspensão proveniente das secreções do testículo e epidídimo, que na altura da ejaculação, são combinados com as secreções da próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretais, constituindo o plasma seminal. Este providencia nutrição e protecção aos espermatozóides durante o seu percurso no tracto reprodutor feminino, ambiente que é usualmente prejudicial para os espermatozóides devido ao seu conteúdo ácido e presença de células do sistema imunitário.

O espermatozóide pode ser dividido em quatro fracções consoante a contribuição de cada interveniente. Assim, as vesículas seminais contribuem com o maior volume (superior a 60%), fornecendo frutose, prostaglandinas, enzimas de coagulação e fibrinogénio (fracção I). A próstata contribui com 20 a 25% do volume total e adiciona fosfatase ácida, ácido cítrico, zinco, enzimas para a coagulação e liquefacção (fracção II). Os espermatozóides provenientes dos testículos constituem apenas 5 a 10% do volume (fracção III), sendo ainda mais reduzida a contribuição das glândulas uretais e bulbo-uretais (inferior a 5%) que adicionam mucoproteínas e IgA (fracção IV).

VALORES DE REFERÊNCIA

Somente através da análise de sémen estandardizada o andrologista é capaz de aconselhar o casal infértil e diagnosticar problemas andrológicos, para finalmente, determinar estratégias terapêuticas, incluindo as técnicas de RHA.

Os parâmetros básicos de análise do espermograma estão estandardizados pela OMS, que descreve variáveis a analisar, métodos de análise e valores de referência (5-6), de modo a haver uma avaliação objectiva da qualidade do espermatozóide com propósitos diagnósticos. A análise de marcadores bioquímicos é opcional (Tabela 1).

Para garantir um serviço de qualidade o laboratório deve realizar actividades de controlo da qualidade internos e externos, efectuar treino do pessoal e usar procedimentos fiáveis.

Tabela 1

Valores de referência segundo a OMS (2002).

volume	2 ml
pH	7,2 - 7,8
cor	normal
cheiro	<i>sui generis</i>
liquefacção	completa 60'
viscosidade	normal
concentração	$\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$
concentração total	$\geq 40 \times 10^6/\text{ejaculado}$
motilidade	$\geq 25\%$ progressiva rápida ou $\geq 50\%$ progressiva
morfologia	$\geq 14\%$ (critérios de Kruger)
vitalidade	$\geq 70\%$
hiposmolaridade	$\geq 60\%$
leucócitos	$< 10^6/\text{ml}$
frutose	$> 13 \mu\text{mol}/\text{ejaculado}$
ácido cítrico	$> 52 \mu\text{mol}/\text{ejaculado}$

VARIABILIDADE DE RESULTADOS

Para uma correcta interpretação dos resultados é necessário considerar dois tipos de variabilidades, a biológica e a técnica. A variabilidade biológica prende-se com variações intra e inter-individuais, relacionadas com os dias de abstinência sexual, estado de excitação sexual na altura da colheita, factores genéticos e a idade do indivíduo. Por outro lado a variabilidade técnica pode dever-se a erro estatístico de contagem (quando se contam menos espermatozóides do que os devidos), erro aleatório (devido a equipamentos e instrumentos defeituosos, improvisações individuais do técnico na altura da análise ou aplicação inconsistente de critérios) e/ou erro sistemático (equipamento ou calibração defeituosos).

Para reduzir a dispersão dos resultados é mais importante obter múltiplas amostras de sémen do que replicar a análise de uma dada amostra (7). Tradicionalmente, na prática clínica é recomendado que pelo menos duas amostras de sémen sejam analisadas para estimar o potencial de fertilidade do indivíduo (5). Castilla et al. consideram esta prática correcta para a motilidade, morfologia e vitalidade, no entanto para a concentração devem ser analisadas pelo menos três amostras (7). Outros autores chegaram a conclusões similares (8-9). Jeyendran sugere que para a obtenção de dados objectivos devem ser analisadas até quatro amostras (10).

COLHEITA DA AMOSTRA

Devido à possibilidade de contaminação, a colheita de esperma deve ser realizada após lavagem e higienização das mãos, por masturbação, cerca de 2 a 7 dias de abstinência sexual e sem recurso a lubrificantes. Deve ser fornecido um recipiente plástico atóxico estéril para a colheita, assim como claras instruções orais e escritas sobre a colheita e sua entrega no laboratório no caso desta ser efectuada fora. Nestas situações recomenda-se a sua entrega em menos de uma hora (ideal 30 minutos), evitando exposição a temperaturas extremas (5). É desaconselhável o coito interrompido, uma vez que normalmente a primeira porção do ejaculado é perdida e é esta porção que normalmente contém maior proporção de espermatozoides. Para além disso pode haver contaminação celular e bacteriológica, e o pH ácido da vagina afecta negativamente a motilidade espermática. Existem preservativos de colheita apropriados, no caso de insucesso de colheita por masturbação, mas raramente são utilizados.

EXAME DA AMOSTRA

Volume

O volume é um dos parâmetros mais oscilantes no estudo da reprodução humana. A técnica de obtenção da amostra, o estímulo ejaculatório, o tamanho e constituição das glândulas sexuais e os dias de abstinência são factores determinantes do volume obtido.

Como a maior proporção do volume provém das vesículas seminais e próstata, um reduzido volume (oligospermia, inferior a 2ml) pode sugerir a infecção, inflamação ou obstrução destas glândulas, colheita incompleta, reduzido período de abstinência sexual, ejaculação retrógrada ou baixos níveis de androgéneos. Um volume reduzido concentra “artificialmente” os espermatozoides. A ausência bilateral dos canais deferentes está frequentemente associada a ausência das vesículas seminais, e estes indivíduos apresentam volume reduzido, ausência de espermatozoides e ausência de frutose.

Por outro lado um volume elevado (hiperpermia, superior a 10ml) pode sugerir uma infecção aguda das glândulas anexas e pode estar associado com oligozoospermia, embora sem significado. Valores inferiores a 1ml são insuficientes para análise devendo ser solicitada nova colheita, tendo em atenção o período de abstinência.

Pode ainda ocorrer uma situação de ausência de ejaculado (aspermia) em casos de ejaculação retrógrada. Nestes casos, deve haver esvaziamento da bexiga antes da colheita e após a ejaculação, deve ser imediatamente recolhida urina para ser processada e analisada.

pH

O pH é determinado pelo equilíbrio das secreções ácidas da próstata e alcalinas das vesículas seminais, variando normalmente entre 7,2 e 7,8 quando avaliado dentro da primeira hora após ejaculação. Valores superiores podem ser indicativos de infecção e valores inferiores podem revelar uma disfunção ou aplasia das vesículas seminais ou uma obstrução dos ductos ejaculatórios.

Cor

Uma amostra normal tem uma cor homogénea branco opaco. Podem ser causas de alteração da cor períodos prolongados de abstinência sexual, processos inflamatórios do trato genital, contaminação com urina, presença de bilirrubina, uso de certos medicamentos ou suplementos vitamínicos. Uma coloração hemática (hematospermia) normalmente sugere sangramento da uretra, mas condições mais sérias como infecções das glândulas acessórias, trauma dos testículos e tumores do trato genito-urinário devem igualmente ser excluídos. A presença de bilirrubina per se tem pouco ou nenhum efeito no esperma, mas sugere doença hepática.

Odor

Normalmente o sémen possui um odor forte e pungente devido à oxidação de espermina (base nitrogenada) produzida pela próstata. Um odor pútrido pode indicar um processo infeccioso.

Aglutinação-agregação

A aglutinação significa que os espermatozoides móveis se juntam uns aos outros cabeça-cabeça, cauda-cauda ou de modo misturado. A presença de aglutinação é sugestivo, mas não evidência suficiente, de um factor imunológico de infertilidade.

A junção de espermatozoides imóveis entre si ou de espermatozoides móveis com outras células não espermáticas ou detritos, é considerado agregação.

Coagulação - liquefação

Logo após a sua emissão o esperma sofre um pro-

cesso de coagulação apresentando-se como uma massa firme, de superfície amorfa. Este processo é dependente da presença de substâncias semelhantes ao fibrinogéneo segregadas pelas vesículas seminais, que são activadas pela enzima vesiculase segregada pela próstata. A ausência de vesículas seminais ou de vesículas prostática conduzem à ausência de coagulação.

Dentro de 10-20 minutos após ejaculação, este coágulo é liquefeito num sémen normal tomando um aspecto opalescente, translúcido ou semi-translúcido dependendo da concentração de células que possui. Este processo depende da acção das enzimas proteolíticas segregadas pela próstata (proteases, pepsinogénio, amilase e até hialuronidase).

Um esperma normal liquefaz até 60 minutos à temperatura ambiente, mas normalmente ocorre após 15 minutos da colheita. A liquefacção parcial ou incompleta pode sugerir ausência da componente prostática. Estas amostras podem ser submetidas a um processo mecânico de liquefacção pela passagem através de uma agulha de 19G ou por processo químico pelo uso de enzimas proteolíticas como a alfa-amilase. Após a liquefacção os restantes parâmetros devem ser analisados imediatamente.

Viscosidade

O aumento da viscosidade pode estar relacionado com disfunção prostática por inflamação crónica, por exemplo por deficiente produção de espermolisinas prostáticas, podendo intervir na avaliação de várias características do sémen, tais como a motilidade, concentração ou determinação de anticorpos anti-espermatozóides.

A viscosidade diminuída pode estar relacionada com deficiência vesicular com baixa produção de factores de coagulação.

Alterações na liquefacção e viscosidade são relativamente comuns e, presumivelmente, resultam do mau funcionamento das glândulas acessórias. Apesar de dificultarem a análise do esperma e a sua preparação para técnicas de RHA, são provavelmente de pouca relevância para a fertilidade.

Outras células

O ejaculado invariavelmente contém outras células para além dos espermatozóides, referenciadas colectivamente por células redondas.

As mais comuns são células do tracto genito-urinário (células da linha germinativa, células epiteliais da uretra, próstata ou vesículas seminais), leucócitos, hemácias, células de Sertoli e resíduos celulares nucleados não diferenciados. Normalmente estão presentes

em pequenas quantidades (1 a 2%), no entanto, um aumento de qualquer uma delas exige uma investigação minuciosa. Valores superiores a um milhão de leucócitos/ml podem ser indicativos de um processo infeccioso e devem ser efectuados testes microbiológicos e também a análise bioquímica do plasma seminal (5).

A presença de bactérias no sémen é um achado relativamente comum e pode estar relacionado com infecções do tracto genito-urinário. Por vezes também se detectam protozoários e fungos. Os microorganismos mais comuns são *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Ciomegalovirus*, vírus da varicela e herpes genital.

A presença de diferentes tipos de células germinativas no sémen é frequentemente indicação de desordens na espermatogénese.

Concentração

A determinação da concentração de espermatozóides no esperma é um dos principais parâmetros utilizados na avaliação da sua viabilidade e na capacidade de interagir com os ovócitos, sendo factor determinante na eficácia do processo reprodutivo. Diversas metodologias de avaliação da concentração espermática foram utilizadas ao longo dos anos, tais como a câmara de Neubauer, de Makler ou a avaliação espectrofotométrica.

Um esperma com uma concentração normal significa que possui mais do que 20 milhões por ml ou mais do que 40 milhões por ejaculado. A azoopermia é a situação de ausência de espermatozóides e tem de ser confirmada com uma segunda análise após centrifugação e exame cuidado do pellet. Situações de oligozospermia (concentração inferior a 20 milhões por ml) podem ocorrer intermitentemente, devido a doença ou dificuldade na colheita. Habitualmente designam-se as situações de concentração de espermatozóides inferior a 100 mil por ml como criptozoospermia.

Motilidade

A avaliação da **motilidade**, definida como a percentagem de movimento, deve ser realizada imediatamente após liquefacção, devendo ser excluídas situações de exposição a preservativos, espermicidas ou temperaturas extremas.

Um espermatozóide anormal tem problemas de motilidade devido a (i) alterações da hidrodinâmica

devido a cabeça anormal; (ii) estrutura da cauda anormal; (iii) deficiente produção de energia.

A **mobilidade** diz respeito à qualidade do movimento e os espermatozoides podem ser classificados em quatro categorias: d) sem motilidade; c) com motilidade vibratória in situ; b) com motilidade lenta, linear ou não linear; a) com motilidade rápida e linear.

Um sémen dentro da normalidade deve apresentar 50% ou mais de espermatozoides pertencentes às categorias a e b ou, no mínimo, 25% pertencentes à categoria a. Todas as outras situações definem-se como astenozoospermia.

Uma situação extrema de astenozoospermia é a **necrozoospermia**, que se caracteriza por uma motilidade total inferior a 20%, uma motilidade progressiva inferior a 5% e um teste de vitalidade inferior a 30/40%, indicando uma elevada proporção de espermatozoides mortos. Devem ser excluídas situações de auto-imunidade e problemas na colheita. Esta situação pode variar na gravidade e em função da frequência do coito. É característico da necrozoospermia um aumento da motilidade com o aumento da frequência de ejaculações. Esta situação pode dever-se a armazenamento defeituoso dos espermatozoides na cauda do epidídimo, lesões da espinhal medula ou doença do rim policístico com quistos associados na região dos ductos ejaculatorios (11).

Uma outra causa rara de infertilidade é a **síndrome dos cílios imóveis**, na qual a motilidade dos espermatozoides está muito reduzida ou ausente. Os pacientes com esta afecção apresentam tipicamente história de infecções crónicas do tracto respiratório. A causa da imobilidade dos espermatozoides é a ausência dos braços de dineína do axonema na cauda dos espermatozoides e nos cílios presentes nas células do epitélio respiratório. Aproximadamente 50% destes pacientes apresentam concomitantemente situs inversus, patologia denominada por síndrome de Kartagener. No caso da infertilidade, o diagnóstico é feito por microscopia electrónica. Em suma, na avaliação de um paciente infértil cujo espermograma revele a presença de espermatozoides com motilidade muito baixa ou nula, e vitalidade normal, deve ser solicitada a realização de microscopia electrónica. Actualmente, as técnicas de reprodução assistida (FIV/ICSI) fornecem a única opção terapêutica para este tipo de infertilidade.

Morfologia

Para avaliação da morfologia cora-se um esfregaço pelo método Shorr, de Diff-Quik ou de preferência pelo método Papanicolau.

Um espermatozoide normal tem a cabeça levemente ovalada, única, lisa, com contornos regulares, núcleo e acrossoma facilmente reconhecíveis, sem restos citoplasmáticos e com o acrossoma ocupando cerca de 40% a 70% da cabeça. O diâmetro varia de 3 a 5 μm , podendo apresentar até dois vacúolos citoplasmáticos. A peça intermediária deve medir de 6 a 10 μm , alinhar-se com o eixo longitudinal da cabeça e não apresentar expansões laterais. A cauda será única e desenrolada, com um tamanho de 45 μm . No entanto, no geral os espermatozoides são muito variáveis na aparência e a avaliação morfológica é altamente subjectiva e difícil de standardizar entre laboratórios.

Em 1992, segundo a OMS a morfologia espermática normal é definida pela presença de 30% ou mais de formas normais (12). Todavia, em 1999, adoptaram-se os critérios estritos de Kruger baseados na avaliação morfológica e subsequente performance em fertilização in vitro, nos quais um espermograma com morfologia normal tem um número superior a 14% de formas normais. A designação de teratozoospermia aplica-se para valores inferiores a 14%, sendo os valores entre 4 e 14% considerados *borderline*.

A **globozoospermia** é um caso particular de morfologia normal zero por ausência de acrossoma, pelo que os espermatozoides apresentam uma forma arredondada.

Normalmente um espermatozoide anormal apresenta múltiplos defeitos. Na morfologia prévia quando estavam presentes múltiplos defeitos apenas se referenciava um, com prioridade aos defeitos da cabeça sobre os do colo e peça intermediária e, finalmente, sobre os da cauda. Em 1992 a OMS recomendou o resultado expresso em número total de defeitos dividido pelo número de espermatozoides anormais, medida definida como **índice de teratozoospermia (TZI)** (12-15), que constitui um indicador do número médio de anomalias presente num espermatozoide anormal.

De acordo com o manual da OMS cada espermatozoide pode ter uma de quatro anomalias: anomalias da cabeça, colo/peça intermediária, cauda ou a presença de restos citoplasmáticos (12)¹. Estas anomalias podem ocorrer com defeito único ou numa combi-

¹ A OMS definiu quatro categorias de defeitos: cabeça, colo e peça intermediária, cauda e presença de restos citoplasmáticos. As anomalias da cabeça podem dever-se a defeitos forma e tamanho da cabeça (grande, pequena, piridiforme, vacuolizada, acrossoma pequeno/grande, bicéfala). As anomalias do colo e peça intermediária podem ser por inserção anormal, peça intermediária fina, espessa ou anormal. As anomalias da cauda incluem cauda pequena, múltipla, enrolada, com ângulo superior a 90°. Os restos citoplasmáticos: devem ser superiores a metade da cabeça e normalmente localizam-se na peça intermediária. Além disso, deve analisar-se as chamadas formas imaturas que são definidas como células esféricas que apresentam diâmetro nuclear entre 4 e 9 μm e ausência de cauda (12).

nação de duas, três ou quatro simultaneamente (6,16). Deste modo o TZI varia entre 1 (cada espermatozóide anormal tem apenas um defeito) até 3 (cada espermatozóide anormal apresenta os e defeitos: cabeça, peça intermediária e colo). Um TZI superior ou igual a 1,64 está associado a baixas taxas de gravidez em casais inférteis (13).

Um outro índice utilizado é o **índice de deformidade espermática** (SDI), que é definido como o número médio de defeitos por espermatozóide analisado e calcula-se pela razão entre o número total de defeitos sobre o número total de espermatozóides.

O SDI tem sido considerado um bom indicador sobre o sucesso de fertilização in vitro, especialmente quando a percentagem de morfologia normal é inferior a 5% (17). Um SDI superior a 1,6 tem sido associado à presença de danos no DNA espermático (18) e a falha de fertilização in vitro (17).

O SDI tem sido utilizado como indicador da apoptose, uma vez que subpopulações de esperma não apoptótico apresentam superior qualidade morfológica do que subpopulações apoptóticas, conforme reflectido por valores inferiores de SDI. A percentagem inferior de espermatozóides morfológicamente normais em fracções com apoptose pode dever-se em parte à inclusão de espermatozóides com danos no acrossoma, peça intermediária e restos citoplasmáticos (18).

Estes índices são informativos da função espermática in vivo e in vitro.

Vitalidade

A vitalidade reflecte a proporção de espermatozóides que estão vivos, independentemente de serem móveis ou não. Habitualmente usa-se uma combinação dos corantes eosina e nigrosina. Esta técnica baseia-se no facto de que as células mortas ficam coradas devido à perda da selectividade das suas membranas permitindo a entrada dos corantes.

A análise da vitalidade providencia uma validação da motilidade, uma vez que a percentagem de células mortas não deve exceder a percentagem de espermatozóides imóveis. Este teste deve ser sempre realizado quando a motilidade é inferior a 30% e pode ser um auxiliar importante no diagnóstico de outras causas de alterações na motilidade, tais como necrozoospermia, síndrome dos cílios imóveis, problemas genéticos, etc. (5). Um sémen considerado normal deve apresentar no mínimo 70% de espermatozóides vivos (6).

Hipoosmolaridade

A finalidade do teste de hipoosmolaridade é ava-

liar a integridade funcional da membrana celular dos espermatozóides quando estes são colocados numa solução hipoosmótica. Inicialmente, ocorre uma entrada de líquido para o interior da célula com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio osmótico. Como resposta a esse facto, a membrana dos espermatozóides incha-se formando espaços líquidos na cauda dos espermatozóides. A presença de edema indicará que o transporte de fluidos através da membrana ocorreu normalmente, sendo esta, considerada íntegra do ponto de vista funcional.

Este teste deve ser realizado nos casos de astenozoospermia importante (motilidade espermática inferior a 30%). Além disso, permite escolher um espermatozóide para microinjectar em situações de necrozoospermia, ao possibilitar a diferenciação do espermatozóide vivo com ausência de motilidade e o espermatozóide morto. Quando mais de 60% dos espermatozóides apresentam edema de cauda é considerado resultado normal.

Pesquisa anticorpos anti-espermatozóides

Uma vez que os espermatozóides maduros são produzidos após a puberdade, podem ser reconhecidos como proteínas estranhas pelo sistema imunitário do homem, uma vez que possuem metade dos cromossomas das células normais. Se houver quebra da barreira hemato-testicular (por vasectomia, obstrução do trato seminal, reparação de varicocele, biópsia testicular, torção, trauma ou infecção) pode iniciar-se uma resposta imunitária (desde que os espermatozóides entrem em contacto com o sangue). Os anticorpos anti-espermatozóides estão presentes em até dois terços dos homens vasectomizados. Entretanto, tais anticorpos são geralmente vistos apenas nos primeiros meses após a vasectomia, diminuindo seus níveis com o passar do tempo.

Na mulher a introdução de espermatozóides através de relações sexuais ou inseminação artificial não parece ser um factor de produção de anticorpos anti-espermatozóides, no entanto, eventos que induzam trauma ou introdução de espermatozóides através das membranas das mucosas fora do trato reprodutor, podem induzir a formação de anticorpos anti-espermatozóides (p.e. trauma da mucosa vaginal durante relações sexuais, deposição de espermatozóides no trato gastrointestinal via relações sexuais orais/anais).

Os espermatozóides cobertos com tais anticorpos podem falhar tanto na migração pelo colo uterino, como em atingir o local da fertilização ou em fertilizar o ovócito.

Os anticorpos anti-espermatozóides pertencem

quase que exclusivamente às classes das imunoglobulinas IgA e IgG. Os anticorpos IgA encontrados no sêmen ou no muco cervical têm maior impacto clínico do que os anticorpos IgG, ainda que sejam menos abundantes do que estes. Os anticorpos IgM, devido ao seu elevado peso molecular, raramente são encontrados no sêmen. A incidência de anticorpos anti-espermatozoides em casais inférteis varia de 10 a 30%.

O primeiro passo de todos os métodos de avaliação da presença de anticorpos anti-espermatozoides é a preparação das amostras. Os anticorpos podem ser pesquisados no plasma sanguíneo e no plasma seminal. Além disso, os testes directos têm a capacidade de mostrar anticorpos ligados à superfície do espermatozoide. Os testes mais utilizados para detectar a actividade antiespermática são o mixed antiglobulin teste (MAR) e o immunobead teste (IBT).

O teste MAR baseia-se numa modificação do teste de Coombs e tem condições de mostrar, no líquido seminal, os anticorpos da classe IgG ligados à superfície do espermatozoide. São consideradas positivas as amostras que apresentam percentual de ligação igual ou superior a 10%.

O teste IBT baseia-se na utilização de esferas de poliacrilamida revestidas com anti-imunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Consideram-se positivas as amostras que têm percentual de ligação igual ou superior a 20%. Além da detecção da IgG, esta técnica possui como vantagem ao teste MAR a possibilidade de detecção adicional da IgM e IgA.

Ambos os métodos para avaliação dos anticorpos ligados à superfície dos espermatozoides são simples e rápidos. Suas limitações estão ligadas ao facto que de que não podem ser executados em amostras seminais com oligozoospermia grave e/ou astenozoospermia importante (motilidade igual ou inferior a 30%).

TESTES OPCIONAIS

Marcadores bioquímicos

Existem vários marcadores bioquímicos da função das glândulas acessórias, por exemplo, o ácido cítrico, zinco, fosfatase ácida e glutamil transpeptidase para a **próstata**, a frutose, prostaglandinas e glucosidase para as **vesículas seminais**, a N-carnitina, glicerofosfocolina e α -glucosidase neutra para o **epidídimo**. Pode ainda ser doseado a inibina B como marcador das células de Sertoli.

Como princípio geral a diminuição dos marcadores significa deficiência nas suas secreções ou obstrução distal dos deferentes. Uma infecção pode, por

vezes, causar decréscimo das secreções dos marcadores, mas apesar disto a maioria permanecerá em níveis normais. Uma infecção também pode provocar lesão irreversível do epitélio das glândulas, pelo que mesmo após tratamento, a secreção pode permanecer baixa (5).

O sêmen de um homem com obstrução dos ductos ejaculatórios ou agenesia dos canais deferentes e vesículas seminais é caracterizado por baixos níveis de frutose e, simultaneamente, baixo volume, baixo pH, ausência de coagulação e ausência de odor característico.

Cultura seminal

A cultura de plasma seminal permite averiguar a presença de microorganismos, pode ajudar o diagnóstico de infecção das glândulas acessórias. No entanto, é crucial evitar a contaminação durante a colheita e análise do sêmen.

Biópsia Testicular

A extracção de uma pequena amostra de tecido testicular (normalmente em regime ambulatorio) permite estudar a espermatogénese e suas possíveis alterações, sendo realizada nos casos de suspeita da síndrome de célula de Sertoli (na qual as células produtoras de espermatozoides são ausentes) ou para detectar obstruções no sistema de ductos (quando a produção de espermatozoides parece normal, mas se detecta uma oligozoospermia grave).

Por vezes podem ser necessárias múltiplas biópsias num testículo ou ainda em ambos.

Nestes casos, deve ser considerada a criopreservação de espermatozoides retirados durante a biópsia para uso posterior.

Teste de Leucitospermia (Teste de Endtz)

A presença de células redondas no sêmen deve ser cuidadosamente interpretada, pois significa células imaturas da linhagem germinativa e/ou leucócitos. Para um diagnóstico correcto de infecção seminal é necessária a realização de um teste específico para identificar leucócitos, o teste da peroxidase, mieloperoxidase ou teste de Endtz.

Neste teste os granulócitos positivos para peroxidase (leucócitos polimorfonucleares) são identificados por colorações com imunohistoquímica. Contagens leucocitárias superiores a 1 milhão por ml são consideradas anormais.

O teste de Endtz, ao permitir a diferenciação da

presença de células germinativas dos leucócitos, possibilita evitar o uso excessivo de antibióticos quando da presença de somente espermatozóides imaturos. As consequências advindas da leucospermia dependem da composição celular da população de leucócitos, natureza do estímulo patogénico que induz à infiltração leucocitária, estado de activação da população leucocitária e da habilidade das secreções das glândulas acessórias em proteger os espermatozóides das citocinas tóxicas e das espécies reactivas de oxigénio (ROS) geradas pelos leucócitos.

A geração de elevados níveis de espécies reactivas de oxigénio pelos leucócitos pode exercer um efeito deletério importante na função dos espermatozóides como indicado por uma redução importante na motilidade espermática e capacidade de penetração ovocitária.

Teste das Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS)

As ROS são metabolitos de oxigénio que incluem o anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxil, radical hidroperoxil e óxido nítrico. Quando presentes em excesso podem iniciar danos patológicos pela indução de dano oxidativo nos lípidos celulares (peroxidação lipídica), proteínas, DNA e RNA.

A maioria das células está equipada com sistemas enzimáticos antioxidantes (dismutase superóxido, peroxidase glutatona e catalase) ou monoenzimáticos antioxidantes (ácido úrico, vitamina C, vitamina E). Quando estas defesas são ultrapassadas a função celular é afectada.

No ejaculado humano as ROS são produzidas tanto pelos espermatozóides como pelos leucócitos. O plasma seminal possui antioxidantes e enzimas que podem ser diminuídas em alguns indivíduos. A remoção de plasma seminal durante a preparação dos espermatozóides pode colocar estas células à vulnerabilidade do ataque oxidativo.

A toxicidade ao oxigénio é um fenómeno inerente a todas as espécies que necessitam de ambiente aeróbio para a sua sobrevivência. Apesar de a geração controlada de ROS possuir efeitos fisiológicos (segundo mensageiros) em muitos diferentes tipos celulares, o stress oxidativo está relacionado com condições patológicas, como infertilidade e cancro.

De uma maneira geral, as ROS não são detectadas no sêmen de voluntários normais ou homens azoospermicos. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano em determinadas patologias esteja correlacionada positivamente com a geração de espécies reactivas de oxigénio por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica Glicose-6-Fosfato desidrogenase (G-6-PDH).

A motilidade espermática é o indicador mais sensível do stress oxidativo. Baixas concentrações de ROS causam uma diminuição reversível na motilidade espermática devido à depleção do ATP intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema.

Estudos prévios detectaram que 25 a 40% das amostras seminais de homens inférteis apresentam altos níveis de ROS, enquanto que não se evidenciou a sua presença em homens azoospermicos, sugerindo que determinadas causas de infertilidade possam estar associadas com a presença de elevados níveis de ROS (2).

Teste da creatina-quinase

Anomalias nos processos bioquímicos, que são a base energética e de motilidade dos espermatozóides, pode igualmente levar a uma deficiência no potencial de fertilização. A creatina quinase (CK) pode ser considerada uma enzima-chave na produção e utilização de energia nas células porque facilita a manutenção de níveis intracelulares de ATP. Recentes estudos têm mostrado que os espermatozóides com citoplasma residual em excesso possuem defeitos funcionais e estão associados à redução na motilidade. Os níveis de CK correlacionam-se positivamente com o grau de oligozoospermia, independentemente do diagnóstico clínico da infertilidade, sendo, desta forma, considerada um indicador sensível da qualidade seminal e maturidade dos espermatozóides.

Além disso a CK é um importante marcador de teratozoospermia, especialmente quando se avalia pacientes com varicocele. Altos níveis de CK são inversamente relacionados com o potencial de fertilização do espermatozóide, indicando o seu grau de maturação celular.

Experiências avaliando a viabilidade espermática após a criopreservação demonstraram que os espermatozóides de homens inférteis talvez sejam susceptíveis às alterações induzidas pelo procedimento de congelamento seminal indicado pelos níveis reduzidos de CK. Isto talvez ocorra devido a perda do citoplasma durante a remoção da substância crioprotectora antes do processamento da amostra para a actividade da CK.

Teste da Peroxidação Lipídica (LPO)

As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ROS por possuírem grande conteúdo de ácidos gordos poliinsaturados nos fosfolípidios, os quais são particularmente sensíveis a reacções oxidativas. A natureza insaturada das moléculas (ligação dupla) pre-

dispõe os espermatozoides ao ataque das ROS e a peroxidação lipídica (LPO) da membrana plasmática. O radical hidroxila é um iniciador típico da reacção, ao passo que o anião superóxido ou o peróxido de hidrogénio não é considerado energético suficiente para agir como iniciador directo do fenómeno de LPO, muito embora suas conversões para radicais hidroxila pelos iões ferro ou cobre possam resultar na LPO. A propagação da LPO acontece por causa da abstracção de hidrogénio dos grupos metileno de outro ácido gorduroso poli insaturado pelos radicais peroxila, levando a uma reacção em cadeia, culminando na geração de hidroperóxidos lipídicos. Uma vez iniciado tal processo, o acumulo de peróxidos lipídicos ocorre na superfície levando à disfunção ou até à morte do espermatozóide.

A peroxidação lipídica está geralmente associada com uma diminuição da função e viabilidade espermática. Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento de espermatozóide e a sua fusão com o ovócito. Além disso, a LPO prejudica a troca iónica realizada pela membrana do espermatozóide, danificando a motilidade espermática normal.

Análise Computadorizada dos Parâmetros Seminais (CASA)

O principal objectivo da análise computadorizada na avaliação do sémen é o de fazer com que os resultados sejam iguais em diferentes situações e em diferentes laboratórios, principalmente em relação aos sub-parâmetros da motilidade espermática.

A tecnologia empregada nestes sistemas utiliza videomicrografia na determinação das variáveis da motilidade, por meio de monitorização constante e da análise sequencial do movimento dos espermatozoides. Os sistemas CASA medem a concentração e vários parâmetros da motilidade espermática, tais como a velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VL), linearidade (LIN) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ADL).

Na avaliação da motilidade, podem surgir alguns erros, principalmente se a concentração for inferior a 20 milhões por ml ou superior a 100 milhões por ml. Sempre que houver uma disparidade superior a 10% entre a análise manual e a computadorizada, a manual deve prevalecer.

Na avaliação da concentração os resultados não são tão fiáveis devido à dificuldade em diferenciar espermatozoides de detritos, mas isto pode ser minorado com o uso de coloração ADN (5). O mesmo aconte-

ce na avaliação da morfologia, até porque não é totalmente automático. No entanto, o sistema CASA apresenta duas vantagens sobre os métodos manuais: elevada precisão e dados quantitativos sobre a cinética espermática.

CONCLUSÃO

O espermograma, desde que devidamente realizado, ainda continua a ser um exame que providencia muita informação válida ao médico. No entanto, um resultado alterado nunca é conclusivo para o diagnóstico, sendo necessário a sua confirmação num segundo exame. Caso se confirme o diagnóstico de infertilidade de causa masculina é conveniente a observação do homem em consulta de Urologia/Andrologia.

Sendo o espermograma o teste mais importante na avaliação inicial masculina justifica-se que em cada zona o médico de família conheça os laboratórios especializados para onde deverão orientar estes homens.

BIBLIOGRAFIA

1. **Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.:** Report on optimal evaluation of the infertile male. The Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association. *Fertility and Sterility*. 2006;86:S202-209.
2. **Pasqualotto EB, Pasqualotto FF.:** Espermograma e testes de função espermática. *Femina*. 2006; 34(2):91-8.
3. **WHO.:** Interpretation of semen analysis results. A practical guide. Cambridge University Press, 2000.
4. **Ferraz L.:** A importância do Andrologista no estudo e tratamento do homem infértil. *Acta Urológica*. 2006;23:13-16.
5. **WHO.:** Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th Ed, Cambridge University Press, 1999.
6. **WHO.:** Manual on Basic Semen Analysis. NAFA and ESHRE-SIGA. 2002.
7. **Castilla JA, Álvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L.:** Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction* 2006 21(4):847-851.
8. **Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM.:** Variation of semen measures within normal men. *Fertility and Sterility*. 1985;44:396-400
9. **Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM,**

- Skakkebaek NE.:** Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*. 2004;82:358-366.
10. **Jeyendran RS:** Interpretation of Semen Analysis Results, 1st Ed. Cambridge University Press, Cambridge 2000.
11. **Baker G.:** Clinical Management of Male Infertility. www.endotext.org/male/male7/male7.htm.
12. **WHO.:** WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd Ed, Cambridge University Press, Cambridge. 1992.
13. **Jouannet P, Ducot B, Feneux D e Spira A.:** Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 1988;11: 379-94.
14. **Mortimer D, Mortimer ST, Shu MA, Swart R.:** A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test *Human Reproduction*. 1990;5:835 - 841.
15. **Menkveld R e Kruger FT.:** Basic semen analysis. In: Acosta AA e Kruger TF (Eds), *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. Parthenon Publishing, Carnforth, England, 1996:53-71.
16. **Menkveld R, Wong W, Lombard C, Wetzels A, Thomas C, Merkus H, Steegers-Theunissen R.:** Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*. 2001;16:1165-1171.
17. **Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingland.:** CR e Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 1996;66:1000-8.
18. **Aziz N, Mansour GK, Sharma R, Falcone T, Agarwal A.:** The impact of peritoneal fluid from healthy women and women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. Abstracts of the 24th Annual Meeting of the ESHRE, 2008: O-161, p.i65.