

ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS MEDIANTE EL TEST DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA, POST CONGELACIÓN.



Autores: MSc. Lucía Fariñas Rodríguez 1, Lic. Daniela Estévez Martiato 1, Lic. Anamarys Pandolfi Blanco 1, MSc. Miguel Ángel Díaz Martínez 2

1 Centro Nacional Genética Médica

2 Centro de Estudio de Matemática para las Ciencias Técnicas (CEMAT) de la Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría

INTRODUCCIÓN

La integridad del ADN espermático es vital para la fertilización y desarrollo embrionario, con una demostrada asociación negativa entre el alto grado de daño al ADN espermático con la infertilidad y pérdidas de embarazo,

La técnica de Dispersión de la cromatina, utiliza la descondensación como una manera de medir la fragmentación, ya que el ADN fragmentado es el único que puede desnaturalizarse bajo las condiciones utilizadas en este método, generando ADN de simple hebra

La crio preservación de semen es un proceso en el cual los espermatozoides son congelados a muy baja temperatura (entre -80°C y -196°C), de forma que sus funciones vitales se mantienen suspendidas y pueden ser recuperadas tras la descongelación

Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.

Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización

En la criopreservación del semen se debe tener claro que el objetivo es mantener los siguientes requerimientos y propiedades de un espermatozoide para poder fertilizar:

Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito

Capacidad de movimientos progresivos

Para el laboratorio de Estrés oxidativo la posibilidad de congelar las muestras de semen y procesarlas posteriormente, otorgaría una ventaja importante en la satisfacción de la demanda diagnóstica del DAÑO ESPERMÁTICO para la asistencia e investigación

MATERIAL Y MÉTODO

Muestra de semen de pacientes masculinos provenientes de las consultas de infertilidad del CPGM Mayabeque y del H. H. Ameijeira

obtenidas después de un período de abstinencia de 3 a 5 días.

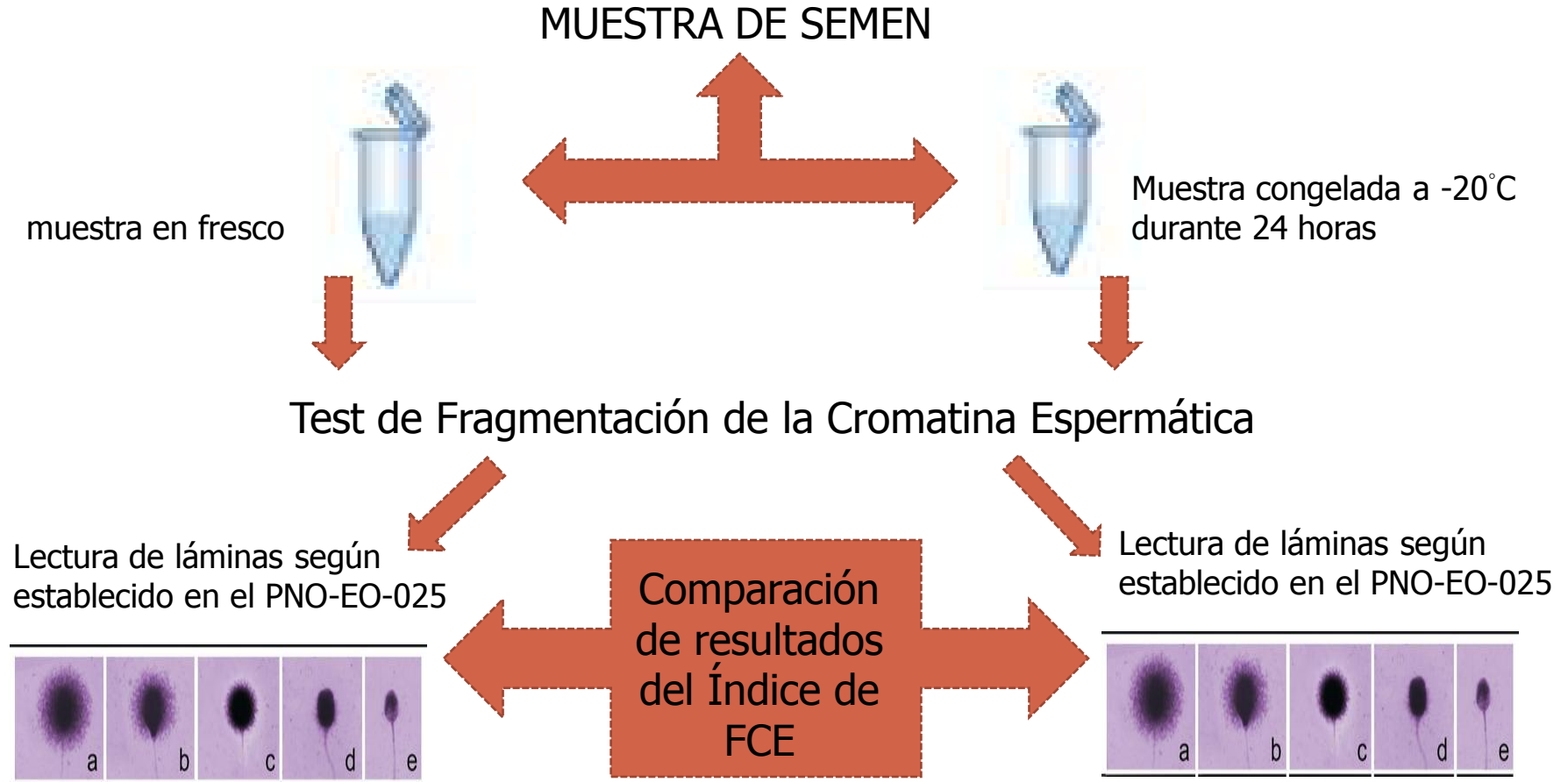
EXPERIMENTO DE CONGELACIÓN:

13 MUESTRAS

INTERCALIBRACIÓN EN LECTURAS DE LÁMINAS:

23 MUESTRAS

EXPERIMENTO DE CONGELACIÓN:



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Anderson-Darling (A-D) para comprobar si las variables tienen distribución de probabilidad normal.

Prueba de hipótesis de comparación de varianzas y Prueba t de comparación de medias

EXPERIMENTO DE INTERCALIBRACIÓN

MUESTRA DE SEMEN



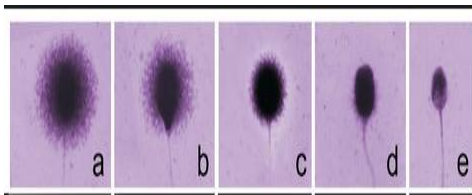
Test de Fragmentación de la Cromatina Espermática



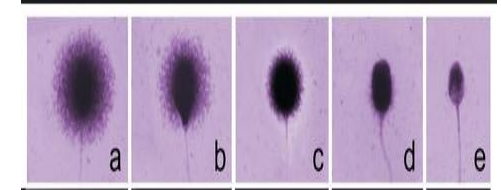
Láminas con las células espermáticas procesadas



Lectura de láminas según establecido en el PNO-EO-025



Re-lectura de láminas en días posteriores



Comparación de lecturas y resultados del Índice de FCE

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Anderson-Darling (A-D) para comprobar si las variables tienen distribución de probabilidad normal.

Prueba de clasificación con signos de Wilcoxon

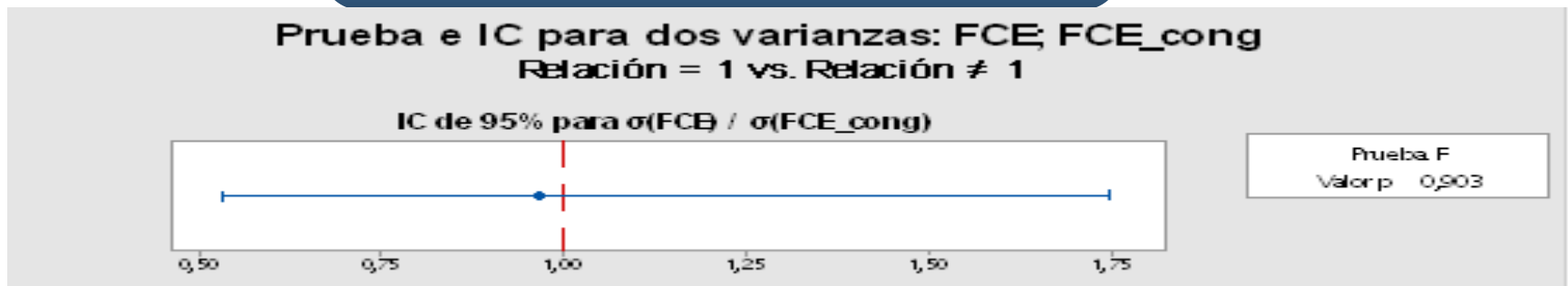
RESULTADOS

EXPERIMENTO DE CONGELACIÓN:

NORMALIDAD

Las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Anderson-Darling (A-D) para comprobar si las variables tienen distribución de probabilidad normal, arrojaron una $p > 0,05$, por lo que no se rechaza la hipótesis de normalidad

COMPARACIÓN DE LAS VARIANZAS



Variable	N	Desv.Est.	Varianza	IC de 95% para Desv.Est.
FCE fresco	13	14,489	209,937	(10,390; 23,918)
FCE_cong	13	15,019	225,580	(10,770; 24,793)

Relación de desviaciones estándar = 0,965

Relación de varianzas = 0,931

Al aplicar la prueba F, no se rechaza la hipótesis de igualdad de varianza por lo que en la comparación de medias se asume igualdad de varianzas

EXPERIMENTO DE CONGELACIÓN:

Intervalo de Confianza y Prueba T pareada: FCE; FCE cong

T pareada para FCE fresco - FCE_congelada

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
FCE fresco	13	30,49	14,49	4,02
FCE_cong	13	31,20	15,02	4,17
Diferencia	13	-0,71	3,86	1,07

IC de 95% para la diferencia media: (-3,04; 1,63)

Prueba t de diferencia media = 0 (vs. $\neq 0$): Valor T = -0,66

Valor p = 0,521

En la prueba t para diferencias de medias el valor p obtenido fue mayor que 0,05 por lo que no se rechaza la hipótesis nula de que la diferencia de las medias sea cero.

ASUMINOS QUE LAS MEDIAS DE LAS DOS VARIABLES SON IGUALES

EXPERIMENTO DE INTERCALIBRACIÓN

NORMALIDAD

Las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Anderson-Darling (A-D) para comprobar si las variables tienen distribución de probabilidad normal, arrojaron una $p < 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis de normalidad

COMPARACIÓN DE LAS VARIANZAS

Al considerarse las variables como muestras pareadas y por el hecho de no ser normales, se aplicó una prueba no paramétrica a la variable : diferencia FCE inicial - FCE Relectura: la Prueba de clasificación con signos de Wilcoxon,

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Desv.Est</u>
FCE inicial	22	19.73	8.539
FCE relectura	22	18.97	8.458

Prueba de clasificación con signos de Wilcoxon:

FCE inic-relec= FCE_inicial – FCE_relectura

(Prueba de la mediana = 0,0 vs. la mediana $\neq$ 0,0

	<u>N</u>	<u>Prueba de Wilcoxon</u>	<u>P</u>
FCE inic-relec	22	156,0	0,164

El valor p fue $p > 0.05$, no se puede rechazar la hipótesis nula, asumiéndose la igualdad de las medianas o sea en este caso no hay diferencia significativa entre las medianas

CONCLUSIONES

1

- No hay diferencia entre las medias de los valores del Índice de Fragmentación Espermático en los dos experimentos realizados: congelación e intercalibración

2

- La técnica de dispersión de la cromatina espermática, puede realizarse después de la congelación directa a menos 20°C, sin que el índice de fragmentación se vea afectado significativamente



IMPACTO:

❖ ECONÓMICO
❖ SOCIAL

- Estos resultados brinda una ventaja importante respecto al tiempo del operador, así como un aprovechamiento de los recursos por una reducción de reactivos al coleccionar las muestras y poder procesar varias el mismo día.
- Imposibilidad de perder una muestra, por llegar después de comenzado el procesamiento.