LensHooke R11 Plus



Indicação de uso

O LensHooke® R11 Plus (Sperm Double Strand DNA Fragmentation Rapid Test Kit – SDFR Assay) é um ensaio in vitro destinado à avaliação da fragmentação de DNA de fita dupla em amostras de sêmen humano. O teste permite estimar a porcentagem de espermatozoides com quebra de fita dupla de DNA, expressa como índice de fragmentação do DNA (DFI). É destinado ao uso profissional.

Por que avaliar a fragmentação de DNA de fita dupla?

A fragmentação do DNA espermático pode envolver quebras em uma ou em ambas as fitas da molécula. Nas quebras de fita simples, apenas uma das fitas é rompida e nas quebras de fita dupla, ambas as fitas são comprometidas em regiões próximas. Esse segundo tipo de lesão pode representar um desafio maior para os mecanismos de reparo do oócito após a fecundação.

A avaliação direcionada à fragmentação de fita dupla pode acrescentar informação à análise seminal convencional e aos testes de fragmentação global. Entretanto, deve ser considerada uma ferramenta complementar, e não um substituto dos demais exames.

O que diferencia o R11 Plus?

O R11 Plus utiliza o ensaio SDFR, desenvolvido para avaliar a fragmentação de DNA de fita dupla. Diferentemente do método SCD convencional, no qual a fragmentação é associada à ausência do halo, no R11 Plus os espermatozoides classificados como fragmentados apresentam um halo de dispersão do DNA. Portanto, os padrões de leitura dos dois testes não devem ser confundidos.

Princípio do método

A amostra de sêmen não fixada é incorporada a um hidrogel formado pela mistura de iniciador, catalisador e solução de gel. Após a solidificação, o gel contendo os espermatozoides permanece aderido à lâmina pré-tratada. Em seguida, a lise das proteínas nucleares e a coloração permitem observar, ao microscópio, o padrão de dispersão do DNA.

- Espermatozoides não fragmentados: ausência de halo de dispersão.
- Espermatozoides fragmentados: presença de halo de dispersão do DNA.

Componentes do kit

Componente	Composição / quantidade informada pelo fabricante
Iniciador de formação do gel (Gel-forming Initiator)	Persulfato de amônio; 2 mL × 1 frasco
Catalisador da formação do gel (Gel-forming Catalyst)	Tetrametiletilenodiamina (TEMED); 2 mL × 1 frasco
Solução de gel (Gel Solution)	Acrilamida/bis-acrilamida; 2 mL × 1 frasco
Solução de lise (Lysis Solution)	Agente redutor; 15 mL × 1 frasco
Tubos de microcentrífuga para preparo da amostra	0,5 mL × 10 unidades
Lâminas pré-tratadas	Agarose de ponto de fusão normal; 5 unidades por caixa × 2 caixas
Lamínulas (Cover Slip)	Vidro; 20 unidades
Lamínulas pré-coradas (Prestained Cover Slip)	Coloração Diff-Quik; 20 unidades
Tubos de microcentrífuga	1,5 mL × 10 unidades

Preparação da amostra

Caso necessário, dilua a amostra para que esta esteja com uma concentração entre 5-10 milhões de espermatozoides/mL. A amostra deve ser preparada de acordo com os procedimentos laboratoriais e as instruções de uso do kit.

Modo de usar

1. Preparação da amostra e formação do gel

1. Adicionar 70 µL da amostra de sêmen preparada a um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL.
2. Adicionar 15 µL do iniciador de formação do gel, 15 µL do catalisador da formação do gel e 70 µL da solução de gel.
3. Homogeneizar cuidadosamente por pipetagem.
4. Retirar 15 µL da mistura e aplicar separadamente nos poços 1 e 2 da lâmina de teste.
5. Colocar a lamínula e aguardar 5 minutos à temperatura ambiente para a solidificação do gel.
6. Remover cuidadosamente a lamínula, levantando-a delicadamente.

2. Lise

7. Adicionar 10 gotas da solução de lise em cada poço e aguardar 5 minutos.
8. Drenar o líquido e absorver o excesso.
9. Adicionar aproximadamente 1 mL de água destilada sobre toda a área de teste e aguardar 2 minutos. Drenar o líquido e absorver o excesso.
10. Repetir a lavagem com aproximadamente 1 mL de água destilada, aguardando mais 2 minutos. Drenar e absorver o excesso.
11. Adicionar 40 µL de PBS 0,01 M ou meio de cultivo tamponado a cada poço e prosseguir imediatamente para a etapa de coloração.

3. Coloração e lavagem

12. Cobrir separadamente cada área de teste com uma lamínula pré-corada (Prestained Cover Slip) e aguardar 1 minuto.
13. Deslizar cuidadosamente a lamínula para removê-la.
14. Realizar três lavagens independentes da lâmina. Em cada lavagem, aplicar 1 mL de água destilada no centro da área de teste e drenar imediatamente.
15. Deixar a lâmina secar ao ar, à temperatura ambiente, entre 15 °C e 30 °C.

Avaliação microscópica e cálculo do DFI

Após a coloração e secagem, avaliar os espermatozoides ao microscópio e classificá-los conforme a presença ou ausência do halo de dispersão do DNA.

Classificação	Padrão observado no R11 Plus
Não fragmentado	Ausência de halo.
Fragmentado	Presença de halo de dispersão do DNA.

O índice de fragmentação do DNA (DFI) corresponde à porcentagem de espermatozoides classificados como fragmentados entre todos os espermatozoides avaliados.

DFI (%) = (Nº de espermatozoides com halo ÷ Nº total de espermatozoides avaliados) × 100

Interpretação dos resultados

- DFI inferior a 8%: associado à previsão de uma boa taxa de desenvolvimento embrionário.
- DFI superior a 19%: descrito como tendo capacidade preditiva para aborto espontâneo.
-

Para resultados entre 8% e 19%: nessa faixa, recomenda-se reportar o valor numérico do DFI, sem atribuir automaticamente uma classificação de bom ou mau prognóstico, e interpretá-lo em conjunto com os demais parâmetros seminais e dados clínicos.

Esses pontos de corte devem ser entendidos como referências preditivas descritas em estudos, e não como limites diagnósticos absolutos ou garantias de desfecho reprodutivo. A literatura destaca que os valores de decisão dependem do método, da população estudada e do contexto clínico. Cada laboratório deve considerar a validação local e as evidências disponíveis.

Armazenamento e estabilidade

- Armazenamento: manter entre 2 °C e 8 °C, com umidade relativa inferior a 70%.
- Após a abertura: manter todos os componentes bem fechados e armazenados entre 2 °C e 8 °C.
- Estabilidade após a abertura: o fabricante informa estabilidade mínima de 3 meses após a primeira abertura.
- Condições de operação indicadas na embalagem: 15 °C a 38 °C, com umidade relativa inferior a 70%.

A validade do produto fechado deve ser verificada no rótulo da embalagem correspondente ao lote.

Limitações

- O teste é destinado exclusivamente à análise de amostras de sêmen humano.
- O ensaio deve ser realizado por profissionais qualificados e treinados.
- O resultado deve ser interpretado em conjunto com os demais parâmetros clínicos e laboratoriais da avaliação da fertilidade masculina.
- Os pontos de corte não devem ser utilizados isoladamente para estabelecer prognóstico individual ou determinar conduta clínica.

Segurança e cuidados

- Utilizar luvas, óculos de proteção e jaleco durante todo o procedimento.
- Realizar o ensaio em ambiente bem ventilado ou sob capela, evitando a inalação de vapores provenientes da solução de lise.
- Não descartar diretamente os reagentes utilizados no ambiente. Seguir as normas laboratoriais para armazenamento e descarte de resíduos.
- Tratar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas.

REGISTRO ANVISA: 81931150020