

## Estudio para la valoración diagnóstica del índice de fragmentación del ADN espermático en una población de pacientes del servicio de esterilidad

### Study for the diagnostic evaluation of the sperm DNA fragmentation index in a patient population of the fertility unit

Albert Blanco, Jordi Ramis, Carlos Aulesa, José M<sup>a</sup> Gris<sup>1</sup>.

Laboratorio de Andrología, Unidad de Laboratorios Clínicos Vall d'Hebron, Barcelona. <sup>1</sup>Servicio de Esterilidad Hospital Maternal Vall d'Hebron.

#### RESUMEN

**Introducción:** en la actualidad los parámetros obtenidos a través del seminograma común no aportan una información completa sobre el potencial fecundante del semen, ya que se observa que un 10-15% de los varones estériles presentan un seminograma normal.

**Objetivo:** el presente estudio ha querido comprobar la utilidad clínica de la determinación del Índice de Fragmentación del ADN espermático (IF), como ayuda diagnóstica de la subfertilidad del varón.

**Diseño:** se procesan 60 muestras de pacientes del servicio de Esterilidad, 42 de pacientes que por su historial clínico presentaban una probada esterilidad y 18 de varones fértiles. Se les ha realizado el seminograma y determinado el IF utilizando un equipo comercial Halosperm® (Halotech D, Madrid) para la preparación de las muestras y un analizador de semen Sperm Class Analyzer (SCA) tipo Computer Assister Semen Assay® (CASA) para la lectura de la fragmentación espermática.

**Resultados:** la sensibilidad del IF en el diagnóstico de la subfertilidad ha sido del 54.8% y la especificidad del 66.7%, con una eficiencia diagnóstica final del 58.3%. El seminograma ha presentado una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 50%, con una eficiencia diagnóstica del 78.9%. A partir de las curvas ROC de los diferentes parámetros se calculan las áreas bajo la curva (AUC) y se obtiene que el IF presenta una AUC=0.601 y el seminograma una AUC=0.679, lo que indica que el seminograma tiene un superior valor diagnóstico.

**Conclusiones:** con los datos obtenidos podemos concluir que el test IF no parece presentar un valor diagnóstico superior a los parámetros clásicos del seminograma, pero hemos observado que un resultado patológico en el IF puede ser un factor a tener en cuenta para aquellas parejas que todavía presenten dudas para acceder a otras técnicas de reproducción asistida o a la Inseminación Artificial de Donante (IAD).

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 55-59 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Palabras clave:** *Subfertilidad del varón, Índice de Fragmentación del ADN espermático, Halosperm® (Halotech D, Madrid), analizador de semen tipo Computer Assister Semen Assay®.*

Aceptado 7 Marzo 2011

Autor para correspondencia: Carlos Aulesa, Unidad de Andrología, Hospital Infantil. Ciudad Sanitaria Vall d'Hebrón, Barcelona. Paseo Vall d'Hebrón 119-129. Barcelona (08035), Spain. E-mail: caulesa@vhebron.net

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

---

## SUMMARY

**Introduction:** At present, parameters obtained via the common seminogram fail to provide complete information on the fertilizing potential of semen, as it is observed that between 10 to 15% of sterile males show a normal seminogram.

**Objective:** This study has verified the clinical utility of determination of the sperm DNA Fragmentation Index (DFI) as a diagnosis aid to male subfertility.

**Design:** 60 samples were processed from patients at the Fertility Unit, of which 42 patients showed proven infertility due to their clinical history, the remaining 18 were fertile males. The corresponding seminogram and FI were carried out using Halosperm® (Halotech D, Madrid) commercial equipment for the preparation of samples and a Sperm Class Analyzer (SCA) type Computer Assister Semen Assay® (CASA) for reading the sperm fragmentation.

**Results:** The FI sensitivity in diagnosis of subfertility was 54.8% and the specificity 66.7%, with a final diagnostic efficiency of 58.3%. The seminogram showed a sensitivity of 8.7% and a specificity of 50%, with diagnostic efficiency of 78.9%. The areas under the curve (AUC) are calculated from the ROC curves; it is shown that the FI presents a AUC=0.601 and the seminogram a AUC=0.679, which indicates that the seminogram has a higher diagnostic value.

**Conclusions:** Further to the data obtained, we reach the conclusion that the FI test does not appear to show a higher diagnostic value than the classic parameters of the seminogram. Likewise, we have observed that a pathological result in the FI can be a factor to consider for those couples who still have doubts about exploring other assisted reproductive techniques or Artificial Insemination by donor (AID).

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 55-59 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

**Key words:** *Subfertility of males, sperm DNA Fragmentation Index, Halosperm® (Halotech D, Madrid), Computer Assister Semen Assay® semen analyser.*

## INTRODUCCIÓN

La esterilidad afecta a casi un 20% de las parejas en edad reproductiva y no en todos los casos la etiología se puede determinar. Aproximadamente en la mitad de los casos está involucrado el factor masculino y su evaluación requiere esencialmente el análisis del semen. El seminograma nos informa del estado clínico del sistema reproductivo del varón, pero no aporta una información completa sobre el potencial fecundante del semen, ya que se observa que un 10-15% de los varones estériles presentan un seminograma considerado normal (1, 2, 3).

El análisis del Índice de Fragmentación del ADN espermático (IF) puede suponer una aportación adicional en el estudio del semen del paciente, considerando que la transferencia del ADN íntegro desde el espermatozoide al óvulo puede ser esencial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito (2, 3).

La aparición de equipos comerciales para la preparación de las muestras, como Halosperm® (Halotech D, Madrid), y la utilización de analizadores automatizados tipo Computer Assister Semen Assay® (CASA), equipados con mó-

dulo específico de estudio de la fragmentación de ADN, ha posibilitado la determinación del test IF con una mínima fiabilidad metodológica y reproducibilidad (4), que no eran posibles hasta ahora con los métodos manuales.

El objetivo de este estudio ha sido la determinación del IF en una serie de varones fértiles, para validar y establecer el intervalo de referencia de la técnica y la realización del IF en un grupo de pacientes de probada esterilidad, a los que se había realizado también un seminograma y determinar la utilidad clínica de este nuevo parámetro en el diagnóstico de la subfertilidad del varón.

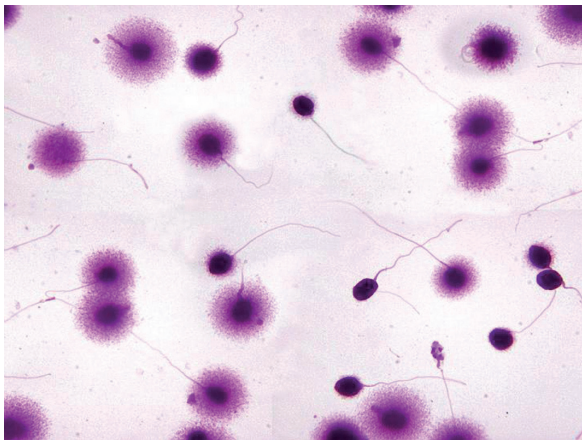
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Se han estudiado 60 muestras de varones provenientes de la Unidad de Esterilidad de nuestro hospital, que presentaron una media de edad 36 años con un rango entre 29-44 años. De estos, 18 eran varones fértiles, y 42 eran pacientes de probada esterilidad, que presentaron como mínimo una de las siguientes indicaciones clínicas: tres fallos en la Inse-

FIGURA 1

Imagen de un campo de una muestra, preparada para efectuar la lectura automatizada de la diferenciación de la fragmentación espermática (espermatozoides con el ADN fragmentado y espermatozoides con el ADN intacto)



minación Artificial con semen del Cónyuge (IAC), abortos recurrentes, mala calidad embrionaria, esterilidad idiopática de la pareja, o patologías androgénicas como varicocele o criptoquidia.

### Seminograma

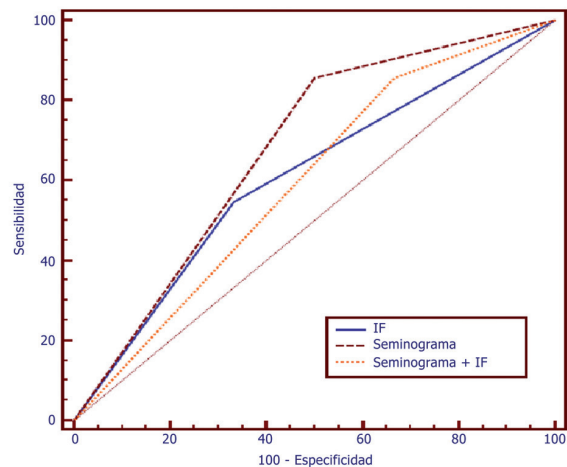
La recogida de semen se ha realizado siguiendo la normativa de la OMS y de la ESHRE (5, 6). El análisis de la concentración y movilidad espermáticas se han efectuado mediante el analizador Sperm Class Analyzer, un equipo automatizado de análisis de Semen tipo CASA. El análisis de la vitalidad se ha realizado siguiendo el método recomendado por la OMS, con la tinción eosina-nigrosina al 10% (5). Finalmente, se ha realizado el estudio de la morfología espermática siguiendo los criterios de Kruger (6, 7) y empleando el método rápido de tinción Diff-Quick® (Allegiance Healthcare Corp, McGraw Park, IL USA), con un conteo manual de un mínimo de 200 espermatozoides. Los valores de referencia que hemos seguido son los establecidos por la OMS para la concentración (>40 millones espermatozoides/eyaculado), la movilidad (a+b OMS>50%) y la vitalidad espermática (>50% vitales), y para la morfología espermática hemos escogido el criterio de Kruger (>15% espermatozoides normales) (4).

### Índice de Fragmentación del ADN espermático (IF)

Se ha realizado el IF mediante la técnica Sperm Chromatin Dispersión (SCD), con un equipo comercial Halosperm® (Halotech D, Madrid) para la preparación de las muestras, efectuando las lecturas con un analizador automático de sé-

FIGURA 2

Curvas ROC del IF, del seminograma y de ambos conjuntamente



menes SCA tipo CASA equipado con módulo específico de análisis de fragmentación (Microptic). Se visualizan un mínimo de 500 espermatozoides para la determinación del IF. En la Fig. 1 puede observarse la imagen de un campo de una muestra, preparada para efectuar la lectura automatizada de la diferenciación de la fragmentación espermática (espermatozoides con el ADN fragmentado y espermatozoides con el ADN intacto)

### Métodos estadísticos

La curva ROC es el test estadístico más útil para valorar la eficiencia diagnóstica de un método analítico, y el posterior cálculo de su AUC (área bajo la curva) nos permite cuantificar su valor diagnóstico y compararlo con el de otros métodos analíticos, siendo el que presenta una mayor AUC, el de mejor valor diagnóstico (8, 9, 10, 11). Para determinar además si existen diferencias significativas entre las diversas AUC halladas, se aplica el test no paramétrico de Wilcoxon.

El cálculo de los parámetros estadísticos se ha efectuado con ayuda de los programas estadísticos SPSS (SPSS, Chicago, IL USA) y MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### RESULTADOS

A partir de las muestras de 18 varones fértiles hemos establecido nuestro propio intervalo de referencia para el IF. Éste presentó una media de 15% con un intervalo de confianza (IC) del 95% entre 9-21%. En consecuencia hemos

TABLA 1

ÁREA BAJO LA CURVA CALCULADAS A PARTIR DE LAS CURVAS ROC DE LAS FIGURAS 2 Y 3. En ningún caso las diferencia entre los diferentes parámetros son estadísticamente significativas (no publicado)

	AUC	95% CI
IF	0,607	0,473 a 0,731
Seminograma	0,679	0,545 a 0,793
Seminograma + IF	0,595	0,461 a 0,720
Morfología	0,659	0,525 a 0,776
Movilidad	0,623	0,489 a 0,745
Recuento	0,651	0,517 a 0,769
Vitalidad	0,651	0,517 a 0,769

interpretado como patológicos los IF superiores a 21%. El coeficiente de variación intradía (CV) de la técnica se calculó procesando 10 veces una muestra con un valor medio de 19%, y resultó del 8%.

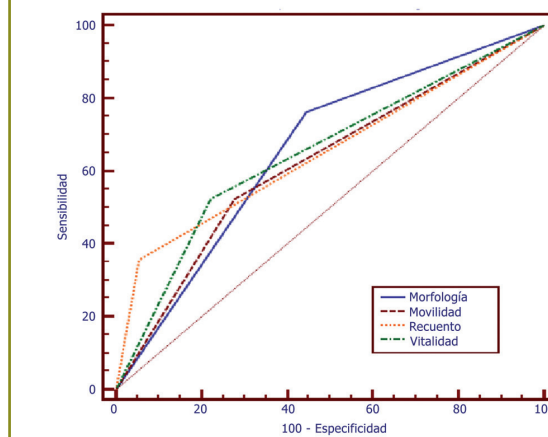
Se ha estudiado una muestra de 60 varones, de los cuales 18 eran varones fértiles y 42 pacientes eran varones de probada esterilidad. Se observa que el nuevo parámetro IF ha presentado una sensibilidad del 54.8% y una especificidad de 66.7%, con una eficiencia diagnóstica del 58.33% en el diagnóstico de la subfertilidad del varón. El seminograma ha presentado una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 50%, con una eficiencia diagnóstica del 78.9%.

A partir de los resultados anteriores se construyen las curvas ROC (Receiver-Operating Characteristic) del IF y del seminograma completo, tal y como se muestra en la Fig. 2. Seguidamente se calculan las AUC correspondientes con su IC del 95%, que se muestran en la Tabla 1. Los resultados indican que el seminograma presenta una AUC=0.679, frente a un AUC=0.607 del IF. Según Swet (10), al tener el seminograma una mayor AUC que el IF, es el parámetro que presenta un mayor valor diagnóstico de la subfertilidad del varón. La suma de ambos parámetros para el diagnóstico dibuja una curva con un AUC=0.595.

Si se observan los resultados de las curvas ROC y sus correspondientes AUC de los parámetros del seminograma, que se muestran en la Fig. 3 y en la Tabla 1, se deduce que la morfología espermática, con una AUC=0.659, es el parámetro que presenta una mayor valor diagnóstico del seminograma (11, 12). se aplica el test de Wilcoxon para saber si entre las AUC halladas existen diferencias esta-

FIGURA 3

Curvas ROC de los diferentes parámetros de seminograma



dísticamente significativas, y en ningún caso se observa una  $p < 0,05$ .

## CONCLUSIONES

Desde hace ya algún tiempo nuestra unidad ofrece la posibilidad de la determinación de manera rutinaria de IF. La llevamos a cabo mediante la técnica Sperm Chromatin Dispersión (SCD) con un equipo comercial Halosperm® (Halotech D, Madrid) para la preparación de las muestras y con el empleo de un analizador automático de sémenes Sperm Class Analyzer® (SCA) tipo Computer Assister Semen Assay® (CASA) para las lecturas.

Con el presente estudio hemos querido comprobar la utilidad clínica de la determinación del Índice de Fragmentación del ADN espermático (IF) como herramienta diagnóstica de la subfertilidad en una muestra de 60 pacientes del servicio de Esterilidad.

A partir de una población de 18 pacientes fértiles hemos establecido el intervalo de referencia para la nueva determinación del IF, que presentó una media del 15% con un IC del 95% entre 9-21% y el coeficiente de variación de la técnica resultó del 8%. El valor normal es similar a los que actualmente se encuentran publicados en la bibliografía (12) y el CV en una muestra con un valor cercano al discriminante, ha resultado adecuado para garantizar unos resultados reproducibles.

Los primeros datos obtenidos son los de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad del seminograma es substancialmente mayor a la del IF y su valor es similar al que encontramos en numerosas publicaciones (2, 3, 11). Sin

---

embargo el IF presenta una especificidad mejor. Se podría pensar que los resultados eran previsibles, aunque se esperaría una especificidad todavía más alta para el IF, sobre todo en un grupo de pacientes de estas características.

Los resultados de las AUC de las curvas ROC del seminograma, tanto en su conjunto como de sus parámetros por separado, y del IF nos muestran que ninguna prueba es claramente destacable sobre el resto, puesto que en ningún caso se aprecian diferencias significativas, según el test de Wilcoxon. Tampoco mejora el valor del AUC al diagnosticar con los resultados del seminograma y del IF conjuntamente. De todas maneras sería el seminograma el que al presentar una mayor AUC ofrecería un mayor valor diagnóstico para la subfertilidad del varón, y dentro de los parámetros de éste, sería la morfología espermática la más determinante, por la misma razón.

A partir de los datos puede leer que el seminograma es hasta el momento el mejor método de cribado y que no mejora al añadir a su batería el IF. Éste estaría pensado para un uso en un segundo nivel debido a su mejor especificidad, y de hecho a lo largo de este estudio hemos observado que un valor patológico en el Índice de Fragmentación del ADN espermático bien explicado ha sido un buen argumento para ayudar a decidirse a aquellas parejas que todavía presentaban dudas para acogerse a la inseminación artificial de donante (IAD) o acceder a otras técnicas de reproducción asistida de complejidad superior. Sigue pareciendo coherente pensar que la transferencia de un ADN íntegro desde el espermatozoide al óvulo puede ser esencial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito, y que IF patológicos pueden disminuir significativamente las ya pobres probabilidades de consecución de la inseminación artificial.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Evaluación del daño en el DNA espermático. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. *Actas Urológicas Españolas* 2007;31(2):120-131.
2. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. Morales R., Lledó B., Ortiz José A. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2007; 24(5): 305-307.
3. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fernández JL. et al. *Fertility and Sterility* 2005 84(4): 833-842.
4. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. Fernández JL., Muriel L., Goyanes V. *Fertility and Sterility* 2005 84(4): 860.
5. WHO laboratory: Manual for the examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction 3rd ed. (1999). Cambridge University Press, Cambridge,UK.
6. Manual on Basic Semen Analysis, ESHRE Monographs.ed.U.Kvist and L. Bjorndahl. Oxford University pres, 1999.
7. ESHRE Monografías. Manual de Análisis básico de Semen. SEQC, 2002, Ed. Vigor. Barcelona.
8. Beck JR, Shultz EK. The use of Receiver-Operating Characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 1986,110:13-20.
9. Zweig M.H., Campbell G: Receiver-Operating Characteristic (ROC) plots A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Cli. Chem.* 1993,39:561-77.
10. Swets J.A., Pickett RM. Evaluation of diagnostics systems. New Cork. Academic Press 1982.
11. Value of sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. Muriel L., Meseguer M., Fernández JL. *Human Rreproduction* 11-25-2005:1-7.
12. Burgueño MJ., García Bastos J., González Buitrago J.M. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas.1995. *Medicina Clínica*, vol. 104,17:661-670.