Artículo original
Ginecol Obstet Mex. 2019 enero;87(1):6-19.

# Sorter de citometría de flujo: repercusiones en los indicadores clave de rendimiento de un laboratorio de reproducción asistida

## Flow cytometry sorter: results in the key performance indicators of an assisted reproductive technology.

Yesenia Recio-López,[1] Miguel de Jesús López-Rioja,[2] Cristina Magaly Sánchez-González,[1] Erika Lizette Iñiguez-Arteaga,[3] Francia Stephanie Salas-Rosa,[3] Alejandro Chávez-Badiola[4]

**Resumen**

**OBJETIVO:** Evaluar si la manipulación de gametos con *sorter* de citometría de flujo repercute negativamente en los indicadores clave de rendimiento de un laboratorio de reproducción asistida.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio descriptivo y retrospectivo, llevado a cabo en parejas a quienes se efectuó fecundación *in vitro* mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), con selección espermática, mediante un *sorter* de citometría de flujo, para selección de sexo. El estudio se efectuó en el New Hope Fertility Center de Guadalajara y Ciudad de México, de junio de 2014 a agosto de 2017. Los resultados se compararon con un grupo control seleccionado al azar. Se evaluaron los indicadores decisivos de rendimiento (KPI´s); tasa de fecundación normal, anormal (1PN, ≥ 3 PN) y fallida; tasa de degeneración posterior a ICSI; tasas de segmentación o división, blastocisto, implantación (segmentación y blastocisto) y recién nacido. Se utilizó la prueba t de Student para dos muestras y se consideró estadísticamente significativo el valor de $p < 0.05$.

**RESULTADOS:** Se evaluaron 150 ciclos. Grupo 1: ICSI con selección espermática y *sorter* de citometría de flujo (n = 40); Grupo 2: ICSI sin *sorter* de citometría de flujo (n = 110). Los indicadores clave de rendimiento del grupo 1 disminuyeron; se reportaron tasas de fecundación fallida de 1.6%, blastocisto 17.4%, implantación en la segmentación 10%, implantación en blastocisto 14.2% y de recién nacido 14.5%.

**CONCLUSIONES:** La manipulación de gametos con *sorter* de citometría de flujo reportó un efecto negativo en los indicadores clave de rendimiento del laboratorio de reproducción asistida, específicamente en las tasas de blastocisto, implantación de blastocisto y de recién nacido.

**PALABRAS CLAVE:** *Sorter* de citometría de flujo; indicadores clave de rendimiento; blastocisto; implantación.

**Abstract**

**OBJECTIVE:** To evaluate if the manipulation of gametes with a flow cytometry sorter has a negative effect on the key performance indicators (KPI´s).

**MATERIALS AND METHOD:** Descriptive and retrospective analysis, in couples undergoing In a Vitro Fertilization (IVF) by ICSI, with sperm selection, using a flow cytometry sorter for sex selection. The study was conducted at the New Hope Fertility Center in Guadalajara and Mexico City, from June 2014 to August 2017. The results were compared with a randomly group without a flow cytometry sorter. KPI´s were evaluated; normal fertilization rate, abnormal (1PN, ≥3 PN), failed fertilization, ICSI damage rate, cleavage rate, blastocyst development rate, implantation rate (cleavage and blastocyst-stage) and live birth rate. A Student's t-test was made for two samples considering significant differences with $p < 0.05$.

[1] Médico asociado, New Hope Fertility Center, Ciudad de México.
[2] Director médico, New Hope Fertility Center, Guadalajara.
[3] Embriología, New Hope Fertility Center, Ciudad de México.
[4] Director General, New Hope Fertility Center, Ciudad de México.

**Recibido:** agosto 2018
**Aceptado:** octubre 2018

**Correspondencia**
Yesenia Recio López
drayesenia-recio@nhfc.mx

**Este artículo debe citarse como**
Recio-López Y, López-Rioja MJ, Sánchez-González CM, Iñiguez-Arteaga EL, Salas-Rosa FS, Chávez-Badiola A. Sorter de citometría de flujo: repercusiones en los indicadores clave de rendimiento de un laboratorio de reproducción asistida. Ginecol Obstet Mex. 2019 enero;87(1):6-19.
https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

**RESULTS:** 150 cycles were evaluated. Group 1: ICSI with sperm selection by a flow cytometry sorter (n = 40); Group 2: ICSI without sperm selection (n = 110). Observing with statistical significance a decreased of the KPI´s of Group 1: failed fertilization rate (1.6%), blastocyst development rate (17.4%), implantation rate (cleavage-stage) (10%), implantation rate (blastocyst-stage) (14.2%) and live birth rate (14.5%).

**CONCLUSIONS:** The manipulation of gametes with the flow cytometry sorter, has a negative effect on the assisted reproductive technology KPI´s; specifically, in the blastocyst rate, blastocyst implantation rate and live birth rate.

**KEYWORDS:** Flow cytometer; Key performance indicators; Blastocyst; Implantation.

## ANTECEDENTES

La selección del género ha tenido gran interés a lo largo de la historia,[1,2] ya sea con la intención de encontrar el equilibrio familiar[3-5] o evitar alteraciones genéticas ligadas al sexo como: síndrome X frágil, distrofia muscular de Duchenne, hemofilia, síndrome de Hunter, enfermedad de Fabry, entre otras, incluso para quienes la única forma de prevenirlas era la selección del mismo.[6]

La selección del sexo puede efectuarse en dos etapas: *1)* selección del espermatozoide portador del cromosoma X o Y, según sea el caso[7] y *2)* transferencia selectiva de embriones previamente analizados y seleccionados con base en el cariotipo por diferentes técnicas de biología molecular, como el diagnóstico genético preimplantacional.[8] De manera empírica, las parejas recurren a cambios de alimentación, coito programado y diversas alternativas cuya eficacia no está comprobada, pero tienen la finalidad de logar un embarazo con feto del sexo deseado.[9] De forma poco fundamentada en evidencia, la medicina ha recurrido a diferentes técnicas (*swim-up*, gradiente de albúmina, gradiente de percoll, filtros de sephadex y métodos inmuno-magnéticos), desafortunadamente con tasas de éxito deficientes, relacionadas con la selección de sexo y subsiguiente desuso.[10-14] Es, hasta hace pocos años, que las técnicas de fecundación in vitro han abierto la puerta a estudios genéticos confiables y con capacidad de permitir la selección del sexo, con un margen de error mínimo, mediante el diagnóstico genético preimplantacional.[15-19]

El diagnóstico genético preinplantacional consiste en el análisis de embriones mediante una biopsia, previo a su transferencia e implantación, para identificar anomalías cromosómicas, mutaciones génicas, concordancia de HLA, enfermedades hereditarias y selección del sexo.[20] En 1990 se realizó la primera de estas técnicas, con una biopsia de blastómera por dos grupos de estudio: la primera en Inglaterra, efectuada por Handyside y sus colaboradores, con la finalidad de seleccionar el sexo fetal en una pareja con riesgo de enfermedad ligada al cromosoma X (conocida como deficiencia de ornitin- transcarbamilasa)[21] y la segunda en Estados Unidos, por Verlinsky, para deficiencia de alfa-1 antitripsina.[22] Sin embargo, por recurrir a un tratamiento de fertilización in vitro con fines exclusivos de selección del sexo y la necesidad de técnicas complejas e invasivas, como la biopsia de trofoectodermo, convirtieron esta técnica en una opción subóptima y, en ocasiones, de difícil acceso.[20]

El último intento para selección espermática con fines de selección del sexo incluye el *sorter* de citometría de flujo, que reporta tasas de éxito de 75-85%.[23] Respecto de su uso para selección del sexo, un punto importante a considerar es el potencial de pérdidas espermáticas durante cada paso del proceso y clasificación; así, estas pérdidas se asocian, frecuentemente, con las propiedades de la tinción utilizada y la preparación del equipo técnico que las realiza.

Entre las ventajas del *sorter* de citometría de flujo se encuentran su baja (inseminación intrauterina) y alta complejidad (fertilización in vitro). Esta técnica se describió por primera vez en 1983 por Pinkel D, en un modelo animal (*Microtus oregoni*), al observar que el espermatozoide X contenía 9% más de ADN que el Y;[24] sin embargo, fue patentado por Lawrence Johnson (USDA; U.S. patent 5,135,759), para su aplicación en mamíferos.[25,26] Johnson, en 1993, propuso un modelo teórico-práctico para el uso de un *sorter* de citometría de flujo en humanos, con la finalidad de prevenir enfermedades ligadas al cromosoma X[27]; no obstante, debe considerarse la manipulación que reciben los gametos. En 1995, Levinson y su grupo reportaron el primer embarazo humano logrado mediante *sorter* de citometría de flujo.[28] Finalmente, en 1998, Fugger reportó el *sorter* de citometría de flujo con la primera serie de 13 de 14 recién nacidos vivos sanos de sexo femenino, con una efectividad de 92.9%,[29] aprobada por la FDA en 2001, para la investigación, prevención de enfermedades genéticas y equilibrio familiar.[25,30]

Para llevar a cabo esta técnica, la muestra seminal se tiñe con fluorocromo (Hoechst 33342, BD Pharmingen™, USA), que se adhiere al ADN del espermatozoide, y de esta forma produce la fluorescencia al someterse a rayos ultravioleta. Mediante el citómetro de flujo se detecta la diferencia de fluorescencia entre los espermatozoides X y Y (en la especie humana el espermatozoide X contiene 2.8% más de ADN),[27,31,32] lo que permite seleccionarlos mediante un *sorter*.[33-35] Una parte de la muestra se analiza mediante fluorescencia por hibridación in situ (FISH) y se observa que 80-90% de los espermatozoides seleccionados son X y 60-70% Y.[36-40] Este procedimiento se ha utilizado de forma segura durante 17 años como indicación médica o de balance familiar.[41-45] De acuerdo con las estimaciones, hasta el año 2010 se reportaron 1,300 nacimientos con esta tecnología.[35]

Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en revisar las repercusiones de los tratamientos de fecundación in vitro de pacientes a quienes se realizó selección espermática mediante *sorter* de citometría de flujo, como técnica de equilibrio familiar, para evaluar si la manipulación de gametos tiene efecto negativo o repercute negativamente en los indicadores clave de rendimiento (KPI´s) de un laboratorio de reproducción asistida, además de estimar las tasas de fecundación normal, anormal (1PN, ≥3PN) y fallida; tasas de degeneración posterior a ICSI, segmentación o división, blastocisto, implantación y recién nacido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo y retrospectivo, en el que se incluyeron parejas atendidas en el New Hope Fertility Center de Guadalajara (Jalisco) y de la Ciudad de México, quienes recibieron tratamiento de fecundación in vitro y selección espermática mediante *sorter* de citometría de flujo para selección de sexo por indicación de equilibrio familiar, entre junio de 2014 y agosto de 2017.

Para comparar los indicadores clave de rendimiento del laboratorio se seleccionaron, al azar, las parejas a las que no se les realizó el *sorter* (MicroSort®, México). Se eliminaron las pacientes a quienes se les canceló el ciclo por


https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

falta de respuesta, cuando no se lograron capturar los ovocitos o, bien, de las que no se tuvo información completa.

Se utilizó el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science Armong,* NY, USA) versión 22 y se evaluaron las diferencias emparejadas de los indicadores clave de rendimiento del laboratorio de reproducción asistida, mediante la prueba t de Student para dos muestras, con y sin el uso del *sorter* de citometría de flujo.

### *Estimulación ovárica*

La estimulación ovárica se efectuó con protocolo de mínima estimulación (miniFIV®).[46] La estimulación se inició el tercer día del ciclo, con 50 mg de citrato de clomifeno (Serophene®**,** Merk, Italia) y la aplicación de 150 UI de gonadotrofina coriónica (Merional®, Corne, Suiza) en días alternos a partir del tercer día de estimulación, hasta obtener al menos un folículo dominante de 18-20 mm, independientemente del número total de folículos en la cohorte. El seguimiento folicular se inició con el ultrasonido basal (días 1-3 del ciclo menstrual), seguido de ultrasonido transvaginal (días 8-9 y 10-11) y, posteriormente, todos los días hasta la decisión del disparo, además de la determinación hormonal periódica, según el tamaño del folículo dominante, con la finalidad de identificar de manera oportuna los picos prematuros de LH.

### *Disparo y aspiración folicular*

La aspiración folicular se programó 34-36 horas posteriores a la aplicación del agonista de GnRH (triptorelina 0.5 mg, Gonapeptyl®, Ferring, Alemania) o 250 µg de gonadotrofina coriónica (Ovidrel®, Merck, Italia). En pacientes con pico prematuro de LH (elevación de LH tres veces mayor que la concentración basal), la programación de la aspiración folicular se llevó a cabo entre 4 y 34 horas posteriores a la determinación de LH, y de acuerdo con los protocolos estandarizados de práctica interna.

### *Selección del espermatozoide por el sorter de citometría de flujo (MicroSort®, México)*

La muestra seminal se obtuvo por masturbación, con un periodo de abstinencia de 3-5 días; posteriormente se envió al laboratorio de MicroSort® en la Ciudad de México, en donde se aplicó fluorocromo (Hoechst 33342, BD Pharmingen™, USA), que se adhiere al ADN y produce una fluorescencia al exponerlo a rayos UV, para que mediante la utilización de un citómetro de flujo se detectara la diferencia de fluorescencia entre los espermatozoides X y Y, permitiendo seleccionarlos con el *sorter*.[35]

### *Fecundación y cultivo embrionario*

Los óvulos identificados durante la aspiración folicular se colocaron en Human Tubal Factor (HTF®, Life Global, EUA) durante dos horas hasta su denudación. Dos horas después se aplicó la inyección intracitoplasmática de esperma con identificación de huso meiótico (SL-ICSI). Enseguida de la fecundación, los óvulos se transfirieron a placas NUNCTM 150255 (Nunc, EUA), con medio de cultivo especializado (Global Total®, Life Global, EUA) y se recubrieron con aceite (Life Guard Oil®, Life Global, EUA) para su incubación (Trigas; Astec, Japón): $CO_2$ 8.5%; $O_2$ 6.5%.

La fecundación se verificó 19 horas posteriores a la inyección, la segmentación a las 43 horas, y se continuó con el cultivo extendido a blastocisto, sin cambios en los medios de cultivo o valoración intermedia. Todos los blastocitos obtenidos en el día 5 o 6 de cultivo se clasificaron según los criterios de Gardner y Schoolcraft,[47] asignando un primer número al grado de expansión y eclosión (de 1 a 6). Posteriormente se efectuó una segunda evaluación, con la finalidad de

clasificar la masa celular interna y la calidad del trofoectodermo. Para la masa celular interna se asignaron los grados A, B y C, que correspondieron a numerosas células, estrechamente ligadas, células agrupadas, pero no estrechamente ligadas entre sí, y pocas células débilmente unidas. En cuanto a calidad del trofoectodermo respecta, en los grados A, B y C se evaluó el número de células y tipo de cohesión.

### *Biopsia de trofoectodermo*

Durante los primeros 12 meses del estudio se obtuvieron biopsias de los embriones con trofoectodermo clasificados en A y B y siguiendo los cambios en los protocolos internos, se obtuvo una biopsia de trofoectodermo a todo embrión con células de trofectodermo, independientemente de su clasificación (grados A, B y C).[48] En todos los casos se tomaron biopsias de embriones que, además de su tamaño, tuvieran masa celular interna grados A y B.

Para la biopsia de trofoectodermo, el blastocisto se deposita en placas NUNCTM 150265 (Nunc, EUA) con medio HTFw-HEPES® al 10% de HSA (Life Global, EUA), se recubre con aceite (Life Global Guard Oil, USA) y se sujeta con una pipeta *holding* (Origio, EUA) hasta identificar la masa celular interna. En ese momento se realizó la eclosión, con disparo único de láser de diodo de 1460 nm (Zylos-tk®; Hamilton Thorne, EUA) y se introdujo una pipeta de biopsia (28-32 µm, Origio, EUA) para aspirar entre 4 y 7 células con ayuda del microinyector (CellTram Oil Vario, Eppendorf, EUA). Durante la aspiración pueden efectuarse tres disparos de corte con láser y las células obtenidas en la biopsia se liberan en HTFW-HEPES, para posteriormente lavarlas en solución salina con fosfato estéril (PBS), cargarse en un tubo con medio especializado para la fijación del ADN (IGenomix, México) y enviarlas al proveedor para su análisis.

### *Técnica de análisis cromosómico*

Debido a la transición de las técnicas biomoleculares, los primeros 12 meses (IGenomix, México) se efectuaron por hibridación genómica comparativa con microarreglos (a-CGH) y posteriormente por secuenciación de nueva generación (NGS).

***a-CGH**:* el ADN de las células se amplifica con el sistema SurePlex (Illumina). La muestra de los embriones y de los controles femenino y masculino se marca con los fluoróforos Cy3 y Cy5 según las instrucciones del fabricante.[49] Las muestras se mezclan e hibridan en el microarreglo 24sure (V2 and V3, Illumina) durante 6 a 12 horas. La intensidad de la fluorescencia se detecta con un escáner con láser (Power scanner, TECAN) y los datos se procesan en BlueFuse Multi (v3.2, Illumina). El estudio se completa en menos de 24 horas y los resultados se interpretan de acuerdo con Zegers-Hochschild 2017.[50]

***NGS**:* permite la amplificación de todo el genoma con el sistema de amplificación SurePlex (Illumina). Las bibliotecas se comparan con la incorporación de códigos individuales. Después de la amplificación isotérmica y el enriquecimiento, se efectúa la secuenciación en un chip de 316 o 318, con el equipo de secuenciación PGM (Life-Thermofisher, USA). El análisis de las secuencias y la interpretación de los datos se procesa en el programa Ion Reporter (Life-Thermofisher, EUA).

### *Vitrificación y desvitrificación*

Los procesos de vitrificación y desvitrificación se realizan con Cryotop® (Kitazato, Biopharma, Japón), y de acuerdo con los protocolos previamente publicados.[51] Todos los blastocistos se vitrificaron inmediatamente después de la biopsia de trofoectodermo con Kitazato-Vitrification Kit (Biopharma, Japón), en espera


https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

del reporte del estudio o diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias (PGT-a). Una vez confirmada la euploidia y en el ciclo de preparación endometrial con reemplazo hormonal se desvitrifica solo un blastocisto (Kitazato, Biopharma, Japón), 4-6 horas antes de la transferencia.

### *Transferencia embrionaria, confirmación del embarazo y recién nacido vivo*

Para determinar la cantidad de embriones a transferir en el periodo de segmentación y blastocisto sin PGT-a se siguieron los protocolos internos, en todos los casos en los que se realizó PGT-a, solo se transfirió un blastocisto euploide (≥ 180 µ).

Los embriones se transfirieron en medio con hialuronato (EmbryoGlue®, Vitrolife, Suecia), con guía ultrasonográfica transvaginal y catéter Kitazato® (Kitazato, Japón). Entre 7 y 14 días después de la transferencia se efectuó una prueba de embarazo, con determinación cuantitativa de la fracción beta hCG en sangre para blastocisto y segmentación, respectivamente, continuando el seguimiento hasta documentar los recién nacidos.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para llevar a cabo los protocolos de estimulación ovárica. Previo a la biopsia de trofoectodermo todas las pacientes recibieron asesoría genética y firmaron consentimientos de acuerdo con los protocolos internos y del laboratorio de referencia (IGenomix, México).

## RESULTADOS

En el grupo 1 (*sorter* de citometría de flujo) se registraron 28 parejas, en quienes se llevaron a cabo 40 ciclos, pero se cancelaron 2 por falta de respuesta; por tanto, se estudiaron 38 parejas, con un promedio de 1.43 ciclos para cada una. Respecto a la edad de la mujer, el promedio fue de 36.76 ± 4, con promedio de captura de ovocitos de 3.63 por ciclo e inyectando 138 ovocitos. En cuanto al grupo 2 (sin *sorter* de citometría de flujo) se incluyeron 80 parejas, en quienes se llevaron a cabo 110 ciclos, pero se cancelaron 5; de esta forma se registraron 105 ciclos totales. En promedio se efectuaron 1.37 ciclos por pareja. Respecto a la edad de la mujer, el promedio fue de 36.1 ± 4, con captura de 3.28 ovocitos por ciclo e inyectando 345 ovocitos. **Cuadro 1**

Al comparar los indicadores clave de rendimiento de un laboratorio de reproducción asistida del grupo 1 (*sorter* de citometría de flujo) *versus* grupo 2 (sin *sorter* de citometría de flujo) se encontraron los siguientes resultados:

*Tasa de fecundación:* se obtuvieron valores significativamente mayores en el grupo 1 para fecundación normal 80.4 *vs* 79.1%. Por el contario, se obtuvieron valores significativamente mayores en el grupo 2 para tasa de fecundación fallida (7.8 *vs* 9.42%), ≥ 3 pronúcleo (4.9 *vs* 5.07%) y mayores no significativos para tasa de fecundación anormal 1 pronúcleo (1.7 *vs* 2.89). **Cuadro 2 y 3**

**Cuadro 1**. Características demográficas de la población con y sin uso de Microsort®

| Variables | Con Microsort® | | Sin Microsort® | |
|---|---|---|---|---|
| Número de parejas | 28 | | 80 | |
| Número de ciclos | 40 | | 110 | |
| Promedio de ciclos por pareja | 1.42 | | 1.37 | |
| Porcentaje de ciclos cancelados | 5% | (2/40) | 4.5% | (5/110) |
| Número de ciclos estudiados | 38 | | 105 | |
| Edad promedio de la mujer | 36.76 ± 4 | | 36.1 ± 4 | |
| Promedio de ovocitos capturados por ciclo | 3.63 | | 3.28 | |
| Número de ovocitos inyectados | 138 | | 345 | |

**Cuadro 2.** Resultados en los indicadores clave de rendimiento con y sin uso de Microsort®

| Variables | Con Microsort® | | Sin Microsort® | |
|---|---|---|---|---|
| Número de ovocitos inyectados | 138 | | 345 | |
| Tasa de fecundación normal | 80.43% | (111/138) | 79.1% | (273/345) |
| Tasa de degeneración post-ICSI | 2.17% | (3/138) | 6.4% | (22/345) |
| Tasa de fertilización fallida | 9.42% | (13/138) | 7.8% | (27/345) |
| Tasa 1PN | 2.89% | (4/138) | 1.7% | (6/345) |
| Tasa ≥ 3PN | 5.07% | (7/138) | 4.9% | (17/345) |
| Tasa de segmentación | 98.19% | (109/111) | 93.7% | (255/273) |
| Tasa de blastocisto | 42.34% | (47/96) | 59.8% | (122/204) |
| Transferencias | 25 | | 63 | |
| Promedio de embriones transferidos | 1.36 | | 1.31 | |
| Tasa de implantación en general | 56% | (14/25) | 68% | (43/63) |
| Tasa de implantación en la segmentación | 50% | (3/6) | 60% | (13/20) |
| Tasa de implantación en blastocisto sin PGT-a | 57.9% | (11/19) | 72.1% | (31/43) |
| Tasa de recién nacido | 32% | (8/25) | 46.5% | (20/43) |
| Porcentaje de sexo seleccionado en general (X/Y) | 80.4% | (37/46) | NA | |
| Porcentaje de sexo seleccionado X | 82.6% | (19/22) | NA | |
| Porcentaje de sexo seleccionado Y | 78.3% | (19/23) | NA | |

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, PN: pronúcleo, PGT-a: diagnóstico genético preimplantatorio para aneuploidias.

*Tasa de desarrollo embrionario:* la tasa de segmentación o división fue mayor, sin significación estadística, en el grupo 1 *vs* el grupo 2: 98.19 *vs* 93.7%. Por el contrario, la tasa de blastocisto fue significativamente mayor en el grupo 2: 59.8 *vs* 42.34%, respectivamente. **Cuadro 2 y 3**

*Tasa de implantación:* En el grupo 2 existieron las tasas significativamente mayores de manera general 68 *vs* 56%, para segmentación 60 *vs* 50% y blastocisto sin diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias (PGT-a) 72.1 *vs* 57.89%. **Cuadro 2 y 3**

*Tasa de recién nacido:* En el grupo 2 fue significativamente mayor 46.5 *vs* 32%. **Cuadro 2 y 3**

Las diferencias entre los indicadores clave de rendimiento, con y sin *sorter* de citometría de flujo se resumen en la **Figura 1**.

*Sexo seleccionado:* El grupo 1 tuvo coincidencia con el sexo seleccionado en general de 80.4%, para sexo femenino 82.6% y masculino 78.2%, por debajo de lo que reporta el *sorter* de citometría de flujo (MicroSort®, México), de 88, 90 y 78%, respectivamente.[29] **Figura 2**

La **Figura 3** muestra la comparación de los indicadores clave de rendimiento del New Hope Fertility Center de México (NHFC) con los que sugirió el Consenso de Viena de 2017. [52]

En relación con el diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias (PGT-a) de las 28 parejas del grupo 1 (con *sorter* de citometría de flujo), se analizaron 39 embriones, de los que 51.2% fueron euploides y 48.7% no euploides. Se trasfirieron 16 embriones y se obtuvo una tasa de implantación de 62.5%. Al compararlos con los resultados publicados, donde se analizaron


https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

**Cuadro 3.** Diferencias emparejadas con t de Student para evaluar los indicadores clave de rendimiento con y sin Microsort®

| Con y sin uso de Microsort® | Media | Desviación estándar | Media de error estándar | IC95% de la diferencia | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Tasa de fecundación normal | -.196 | .398 | .034 | -.263 | -.129 | -5.773 | 137 | .000 |
| Tasa de degeneración post ICSI | -.138 | .346 | .029 | -.196 | -.079 | -4.677 | 137 | .000 |
| Tasa de fecundación fallida | -.101 | .303 | .026 | -.152 | -.050 | -3.933 | 137 | .000 |
| Tasa 1 PN | -.014 | .120 | .010 | -.035 | .006 | -1.419 | 137 | .158 |
| Tasa ≥3 | -.072 | .260 | .022 | -.116 | -.029 | -3.272 | 137 | .001 |
| Tasa de segmentación | -.018 | .134 | .013 | -.043 | .007 | -1.421 | 110 | .158 |
| Tasa de blastocisto | -.510 | .503 | .051 | -.612 | -.409 | -9.952 | 95 | .000 |
| Tasa de implantación | -.440 | .507 | .101 | -.649 | -.231 | -4.342 | 24 | .000 |
| Tasa de implantación en la segmentación | -.438 | .512 | .128 | -.711 | -.164 | -3.416 | 15 | .004 |
| Tasa de implantación en blastocisto | -.600 | .500 | .100 | -.806 | -.394 | -6.000 | 24 | .000 |
| Tasa de recién nacido | -.487 | .506 | .081 | -.651 | -.323 | -6.008 | 38 | .000 |

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, PN: pronúcleo.

404 embriones de mujeres de 39 ± 4, 33.16% fueron euploides y 60.89% no euploides, con transferencia de 69 embriones, se obtuvo una tasa de implantación de 73.9%.[53] **Cuadro 4 y 5**

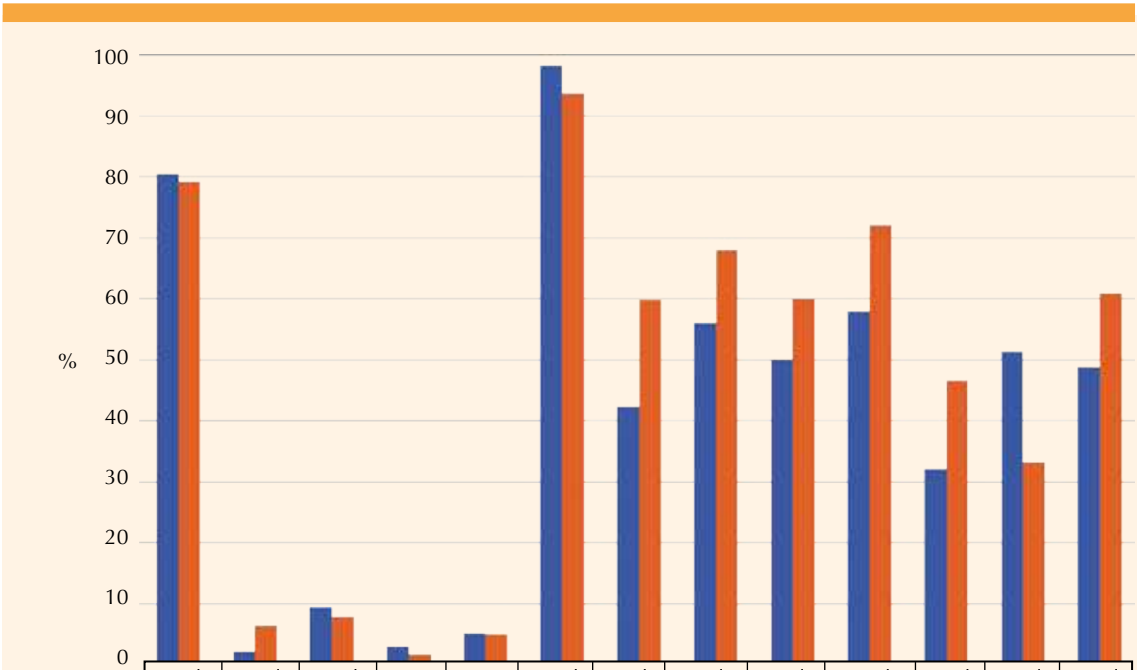
## DISCUSIÓN

Es importante analizar la repercusión de las técnicas de selección de sexo relacionadas con los resultados clínicos y la perspectiva que debe ofrecerse a las pacientes en cuanto a su uso y aplicación. La selección del sexo del futuro hijo ofrece la posibilidad de disminuir el riesgo de trasmitir enfermedades ligadas al sexo. En condiciones normales, la mayor parte de las muestras de semen contienen alrededor de 50% del cromosoma sexual X/Y, respectivamente. El *sorter* de citometría de flujo (MicroSort®) ha demostrado incrementar la posibilidad de obtener un hijo del sexo deseado: femenino en 82.6% y masculino en 78.3%, ambos por debajo de lo reportado en la bibliografía.[35]

Aun cuando de manera general la técnica de selección de sexo mediante algún *sorter* de citometría de flujo se interpreta como no invasiva, la técnica descrita incluye la tinción de espermas con Hoechst 33342,[35] y como cualquier método de manipulación de gametos, existe riesgo de alterar los resultados esperados en los indicadores clave de rendimiento de un laboratorio de reproducción asistida.[52,54]

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, efectivamente, la manipulación de gametos con algún *sorter* de citometría de flujo tiene efecto negativo en la tasa de fertilización y específicamente de blastocisto generado por ciclo iniciado de 42.3%, menor a lo reportado en esta investigación (59.8%), incluso en el resultado de 2016 (47% miniFIV® - 60.5% estimulación convencional).[46]

Si se efectúa el ejercicio con una pareja joven (menor de 35 años) que requiere el protocolo de selección de sexo, en un estudio con *sorter* de citometría de flujo, considerando el efecto negativo de la manipulación de gametos, al disminuir la tasa de blastocisto a 42.3% y tomando en cuenta que es capaz de seleccionar 80.4%




| | Tasa de fecundación normal | Tasa de degeneración post ICSI | Tasa de fecundación fallida | Tasa 1 PN | Tasa 3 o más PN | Tasa de cleavage | Tasa de blastocisto | Tasa de implantación en general | Tasa de implantación en Cleavage | Tasa de implantación en blastocisto | Tasa de recién nacido | Tasa de embriones euploides | Tasa de embriones no euploides |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Con microsort® | 80.43% | 2.17% | 9.42% | 2.89% | 5.07% | 98.19% | 42.34% | 56% | 50% | 57.89% | 32% | 51.28% | 48.71% |
| Sin microsort® | 79.13% | 6.37% | 7.82% | 1.73% | 4.92% | 93.65% | 59.80% | 68% | 60% | 72.09% | 46.51% | 33.16% | 60.89% |

**Figura 1.** Comparación de los indicadores clave de rendimiento (KPI´s) del New Hope Fertility Center (NHFC) de la Ciudad de México, con y sin el uso de Microsort®
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, PN: pronúcleo.

de embriones del sexo deseado, será necesario disponer de nueve óvulos para obtener tres blastocistos y dos embriones del sexo deseado, mientras que al utilizar otra técnica de selección de sexo (*swim up* o gradientes de concentración), que no afecte los resultados de laboratorio, con una tasa de blastocisto generado por ciclo iniciado cercano al 60% y considerando que son capaces de seleccionar 50% de embriones del sexo deseado, habría que obtener ocho óvulos, para de esta forma rescatar cuatro blastocistos y dos embriones del sexo deseado; es decir, sería necesario contar con mayor número de óvulos en el *sorter* de citometría de flujo para obtener el mismo número de embriones del sexo seleccionado con otra técnica no invasiva, con menor costo.

Si a lo anterior se suma que la probabilidad de euploidia promedio en pacientes menores de 35 años es de 48.2%,[55] en ambos casos se tendría un embrión euploide, por lo que no existiría ventaja al realizar el *sorter* de citometría de flujo como técnica de selección de sexo en mujeres jóvenes. Sin embargo, en pacientes mayores de 37 años, en quienes se espera obtener un menor


https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

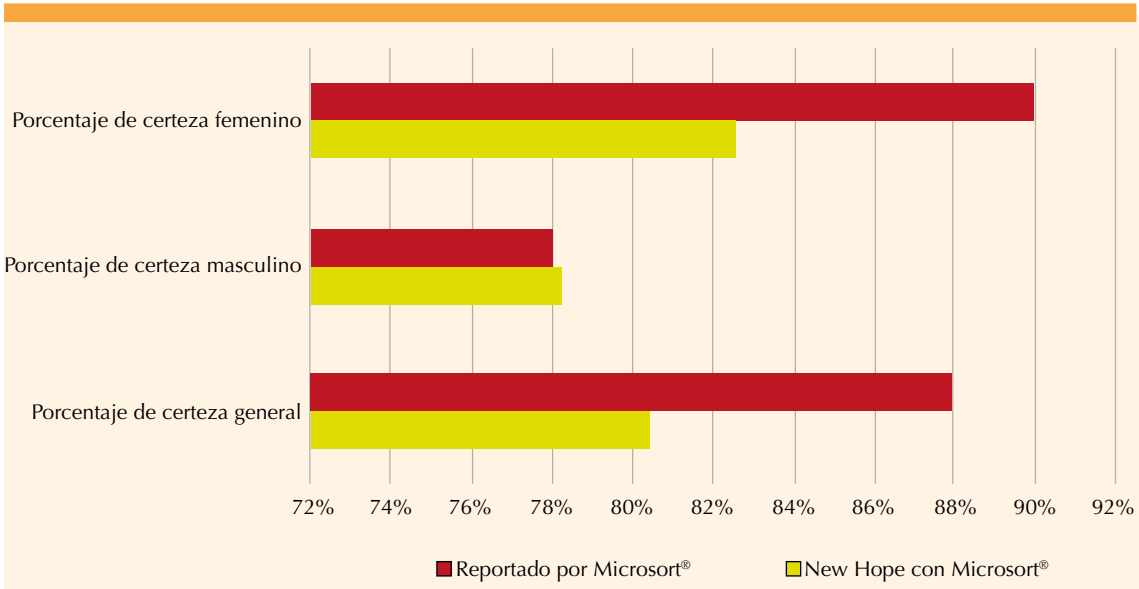
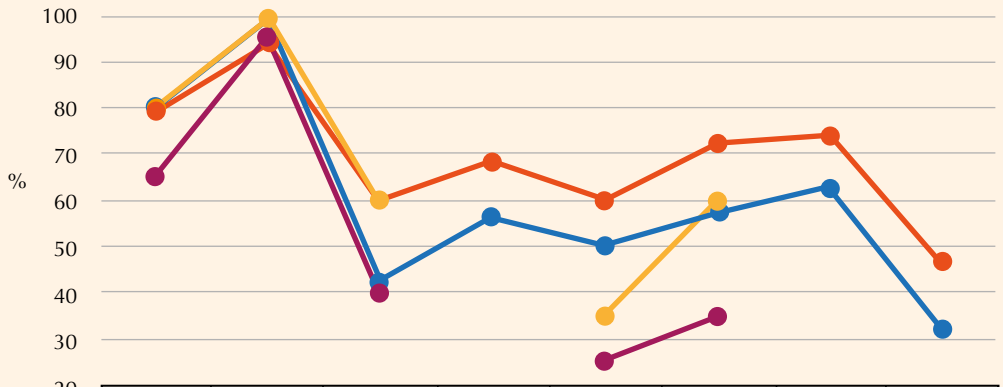
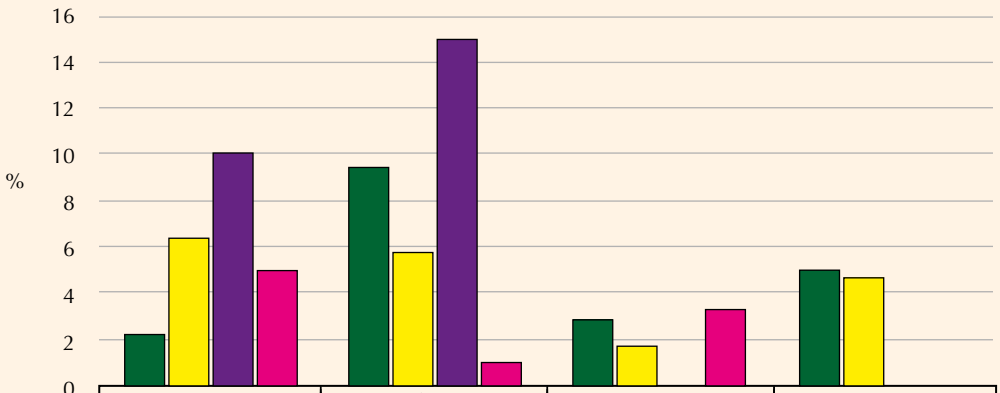



**Figura 2.** Comparación del porcentaje de certeza estimado en el New Hope Fertility Center (NHFC) de la Ciudad de México y lo reportado por Microsort®.




| | Tasa de fecundación normal | Tasa de Cleavage | Tasa de blastocisto | Tasa de implantación en general | Tasa de implantación en Cleavage | Tasa de implantación en blastocisto | Tasa de embriones euploides | Tasa de recién nacido |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NHFC con Microsort® | 80.43% | 98.19% | 42.34% | 56% | 50.00% | 57.89% | 62.50% | 32.00% |
| NHFC sin Microsort® | 79.13% | 93.65% | 59.80% | 68% | 60.00% | 72.09% | 73.91% | 46.51% |
| IDEAL | 65.00% | 95.00% | 40.00% | | 25.00% | 35.00% | | |
| BENCHMARK | 80.00% | 99.00% | 60.00% | | 35.00% | 60.00% | | |

**Figura 3A.** Comparación de los indicadores clave de rendimiento (KPI´s) del New Hope Fertility Center (NHFC) de la Ciudad de México *versus* los que sugiere el Consenso de Vienna.[52]




| | Tasa de degeneración post ICSI | Tasa de fertilización fallida | Tasa 1 PN | Tasa 3 o más PN |
|---|---|---|---|---|
| NHFC con Microsort® | 2.17% | 9.42% | 2.89% | 5.07% |
| NHFC sin Microsort® | 6.37% | 7.82% | 1.73% | 4.92% |
| IDEAL | 10.00% | 15.00% | | |
| BENCHMARK | 5.00% | 1.00% | 3.00% | |

**Figura 3B.** Comparación de los indicadores clave de rendimiento (KPI´s) del New Hope Fertility Center (NHFC) de la Ciudad de México con los que sugiere el Consenso de Vienna.[52]
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, PN: pronúcleo.

**Cuadro 4.** Resultados del PGT-a con y sin Microsort®.

| Resultados del PGT-a | Con Microsort® | | Sin Microsort® | |
|---|---|---|---|---|
| Edad promedio de la mujer | 36.76 ± 4 | | 39 ± 4 | |
| Embriones analizados | 39 | | 404 | |
| Embriones euploides | 51.3% | (20/39) | 33.2% | (134/404) |
| Embriones aneuploides | 48.7% | (19/39) | 60.9% | (246/404) |
| Embriones transferidos | 16 | | 69 | |
| Embriones congelados | 23 | | 65 | |
| Tasa de implantación | 62.5% | (11/16) | 73.9% | (51/69) |

PGT-a: diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias.

número de óvulos, con mayor número de embriones aneuploides, la manipulación invasiva de gametos tendría mayor efecto negativo en el pronóstico reproductivo, por lo que no estaría justificado su uso.

Por último, no se evaluó el *sorter* de citometría de flujo como una técnica de equilibrio familiar en baja complejidad, que aunque se supone que el efecto negativo del laboratorio en la manipulación de gametos puede provocar alteraciones en


https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

**Cuadro 5.** Diferencias emparejadas mediante t de Student para dos muestras. Resultados del diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias con y sin Microsort®

| Con y sin uso de Microsort® | Media | Desviación estándar | Media de error estándar | IC95% de la diferencia | | | | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Inferior | Superior | | | |
| Tasa de embriones euploides | -.487 | .506 | .081 | -.651 | -.323 | -6.008 | 38 | .000 |
| Tasa de embriones no euploides | -.438 | .512 | .128 | -.711 | -.164 | -3.416 | 15 | .004 |

PGT-a: diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidias.

la fertilización en la salpinge, no hay elementos para comprobarlo y permanece fuera del alcance del estudio.

Al término del estudio se habían efectuado 25 transferencias y de estas 56% tuvieron hGC-β positiva y 32% de recién nacidos; sin embargo, deben considerarse todos los factores implicados en lograr un embarazo exitoso como: edad materna, calidad de la muestra espermática, tipo de procedimiento, entre otros que deben tomarse en cuenta para lograr un embarazo.

## CONCLUSIONES

El *sorter* de citometría de flujo tiene como objetivo clasificar a los espermatozoides en X o Y, para de esta forma incrementar la proporción de espermatozoides, según sea el caso, y emplearse en técnicas de reproducción como: inseminación intrauterina (IUI), fertilización in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Esto representa una opción reproductiva para los padres que desean reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con el sexo. Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos en este estudio se demuestra que la manipulación de gametos con el *sorter* de citometría de flujo repercute negativamente en los resultados de laboratorio, específicamente en las tasas de blastocisto generado por ciclo iniciado, de implantación de blastocisto y de recién nacido.

## REFERENCIAS


1. Hewitt J. Preconceptional sex selection. Br J Hosp Med 1987; 37:151-155.
2. Eftekhaari TE, et al. Ethical considerations in sex selection. J Edu Health Promot 2015; 4:32-37. doi: 10.4103/2277-9531.157184.
3. Sills ES, et al. Sex-selection of human spermatozoa: evolution of current techniques and applications. Arch Gynecol Obstet 1998; 261:109-115. doi: 10.1007/s004040050209.
4. Kalfoglou AL, et al. Ethical arguments for and against sperm sorting for non-medical sex selection: a review. Reprod Biomed Online 2013; 26:231-239. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.11.007.
5. Dondorp W, et al. ESHRE Task Force on ethics and Law 20: sex selection for non-medical reasons. Hum Reprod 2013; 28:1448-1454. doi: 10.1093/humrep/det109.
6. Bianchi I, et al. The X chromosome and immune associated genes. J Autoimmun 2012; 38:187-192. doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.012.
7. ftekhaari TE, et al. Ethical considerations in sex selection. J Educ Health Promot 2015; 4:32-35. doi: 10.4103/2277-9531.157184.
8. Harper JC. Preimplantation genetic diagnosis. In: Cambridge: Cambridge University Press. United Kingdom; 2009:274-285.
9. Young SS, et al. Cereal-induced gender selection? Most likely a multiple testing false positive. Proc Biol Sci 2009; 276:1211-1214. doi: 10.1098/rspb.2008.1405.
10. Vidal F, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. Hum Reprod 1993; 8:1740-1743. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137926.
11. De Jonge CJ, et al. Failure of multi tube sperm swim-up for sex pre selection. Fertil Steril 1997; 67:1109-1114. doi: 10.1016/S0015-0282(97)81447-1.
12. Hossain AM, et al. Preconceptional sex selection: past, present, and future. Arch Androl 1998; 40:3-14. PMID: 9465998. doi: 10.3109/01485019808987923.

13. Rodríguez, et al. Fertilization rates and *in vitro* embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silanecoated silica colloid or Percoll. Theriogenology 2012; 78:165-171. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.01.033.
14. Sharma R, et al. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. Syst Biol Reprod Med 2015; 61:1-12. doi: 10.3109/19396368.2014.976720.
15. Ginsburg ES, et al. Use of preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening in the United States: a Society for Assisted Reproductive Technology Writing Group paper. Fertil Steril 2011; 96:865-868. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.1139.
16. Harper JC, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. Hum Reprod Update 2012; 18:234-247. doi: 10.1093/humupd/dmr052.
17. Schoolcraft W, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertil Steril 2010; 94:1700-1706. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.015.
18. Schoolcraft WB, et al. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray–based comprehensive chromosome screening in infertile patients. Fertil Steril 2011; 96:638-640. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.049.
19. Schoolcraft W, Katz-Jaffe M. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. Fertil Steril 2013; 100:615-619. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1972.
20. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. Prenat Diagn 2010; 30:682-695. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.07.007.
21. Handyside AH, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 1990; 244:768-770. doi: 10.1038/344768a0.
22. Verlinsky Y, et al. 1990. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. Hum Reprod 1990; 5:826-829. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137192.
23. Watkins AM, et al. Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2:709-712. doi: 10.1093/molehr/2.9.709.
24. Pinkel D, et al. High-resolution DNA measurements of mammalian sperm. Cytometry 1982;3:1-9. doi: 10.1002/cyto.990030103.
25. Patente de Microsort®. Disponible en: http://www.google.com/patents/US6372422
26. Johnson LA, et al. Flow analysis of X and Y chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. Gamete Res 1987;17: 203-212. doi: 10.1002/mrd.1120170303
27. Johnson LA, et al. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. Hum Reprod 1993; 8:1733-1739. doi: 10.1097/00006254-199405000-00023.
28. Levinson G, et al. DNA based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. Hum Reprod 1995; 10:979-982. doi: 10.1093/molehr/1.2.59.
29. Fugger EF, et al. Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 30:2367-2370. doi: 10.1093/humrep/13.9.2367.
30. Bathia R. Gender before birth. In: Washington: Washington University Press. United States of America; 2018.1-34.
31. Sumner AT, Robinson JA. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. J Reprod Fertil 1976; 48:9-15. doi: 10.1530/jrf.0.0480009.
32. Johnson LA, et al. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. Gamete Res 1987; 16:1-9. doi: 10.1002/mrd.1120160102.
33. Watkins AM, et al. Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996;2:709-711. doi: 10.1093/molehr/2.9.709.
34. De Geyter C, et al. First successful pregnancy in Switzerland after prospective sex determination of the embryo through the separation of X-chromosome bearing spermatozoa. Swiss Med Wkly 2013; 143:1-4. doi: 10.4414/smw.2013.13718.
35. Karabinus DS, et al. The effectiveness of flow cytometric sorting of human sperm (MicroSort®) for influencing a child's sex. Reprod Biol Endocrinol 2014; 12:1-12. doi: 10.1186/1477-7827-12-106.
36. Fugger EF. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. Theriogenology 1999; 52:1435–1444. doi: 10.1016/S0093-691X (99)00228-9.
37. Vidal F, et al. Efficiency of MicroSort flow cytometry for producing sperm populations enriched in X- or Y-chromosome haplotypes: a blind trial assessed by double and triple colour fluorescent in-situ hybridization. Hum Reprod 1998; 13:308-12. doi: 10.1093/humrep/13.2.308
38. Johnson LA, Schulman JD. The Safety of Sperm Selection by Flow Cytometry. Hum Reprod 1994; 9:758-59. PMID: 7929718.
39. Schulman JD, Karabinus DS. Scientific aspects of preconception gender selection. Reprod Biomed Online 2005; 10:111-15. doi:10.1016/S1472-6483(10)62217-1.
40. Karabinus DS. Flow cytometric sorting of human sperm: MicroSort® clinical trial update. Theriogenology 2009; 71:74-79. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.013.
41. Dondorp W, et al. GESHRE Task Force on ethics and Law 20: sex selection for non-medical reasons. Hum Reprod 2013; 28:1448-54. doi: 10.1093/humrep/det109.
42. Munne S. Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental for human embryos. Hum Reprod 1994; 9:758-59. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138590.



https://doi.org/10.24245/gom.v87i1.2492

43. Suh TK, et al. High-pressure flow cytometric sorting damages sperm. Theriogenology 2005; 64:1035-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.002.
44. Garner DL. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. Theriogenology 2009; 71:11-21. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.023.
45. Caroppo E. Sperm sorting for selection of healthy sperm: is it safe and useful? Fertil Steril 2013; 100:3:695-96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.006.
46. Zhang JJ, et al. Minimal stimulation IVF vs conventional IVF: a randomized controlled trial. Am J Obstet Gynecol 2016; 214:96;1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.009.
47. Gardner DK, et al. Analysis of blastocyst morphology. In: Human preimplantation embryo selection. London: Informa Healthcare; 2007;79-87.
48. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol 1999;11:307-11. doi: 10.1016/S0015-0282(97)00438-X.
49. Rodrigo L, et al. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. Biomed Res Int 2014;2014:1-9. doi: 10.1155/2014/517125.
50. Zegers F, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. Fertil Steril 2017; 108:393-406. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
51. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology 2007; 67:73-80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014.
52. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. Reprod Biomed Online 2017; 35:494-510. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.06.015.
53. López MJ, et al. "Estudio genético preimplantación para aneuploidías: resultados de la transición entre diferentes tecnologías". Ginecol Obstet Mex 2018;86:96-107. doi: 10.24245/gom.v86i2.1634.
54. De los Santos MJ, et al. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). Hum Reprod 2016; 31:685-686. doi: 10.1093/humrep/dew016.
55. Munné S, et al. Mosaicism: "survival of the fittest" versus "no embryo left behind". Fertil Steril 2016;105:1146-1149. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.016.


## CITACIÓN ACTUAL

De acuerdo con las principales bases de datos y repositorios internacionales, la nueva forma de citación para publicaciones periódicas, digitales (revistas en línea), libros o cualquier tipo de referencia que incluya número doi (por sus siglas en inglés: Digital Object Identifier) será de la siguiente forma:

### REFERENCIAS


1. Katarina V, Gordana T. Oxidative stress and neuroinflammation should be both considered in the occurrence of fatigue and depression in multiple sclerosis. Acta Neurol Belg 2018;34(7):663-9. doi: 10.1007/s13760-018-1015-8.
2. Yang M, et al. A comparative study of three different forecasting methods for trial of labor after cesarean section. J Obstet Gynaecol Res 2017;25(11):239-42. doi: https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2015.04.015