

Nacimiento de la primera niña en Venezuela con selección de sexo en espermatozoides

Drs. Estrella Rosemberg, María T Olivieri, Sammy Brofenmajer

EMBRIOS. Centro de Fertilidad y Reproducción Humana. Hospital de Clínicas Caracas.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es realizar la selección de sexo de espermatozoides portadores del cromosoma sexual femenino, para lograr el embarazo y nacimiento de una niña.

Paciente de 36 años, III gesta, dos embarazos simples y un gemelar, acude con su esposo a consulta por deseos de tener una hija. Se seleccionaron los espermatozoides portadores del cromosoma X y fueron teñidos con bisbenzimidida y seleccionados por citometría de flujo con tecnología Microsort. La fracción enriquecida fue congelada. Se realizó a la paciente una inducción de la ovulación con agonista de GnRH y FSH. Se realizó la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con los espermatozoides sexados a 9 ovocitos maduros. Se transfirieron dos embriones de 8 células. Se confirmó el embarazo y el sexo femenino diagnosticado por US y amniocentesis, con el nacimiento de una niña normal. Esta es la primera vez, que se aplica con éxito la selección de sexo de espermatozoides en Venezuela, lo que abre caminos para lograr tener un hijo del sexo deseado.

Palabras clave: Selección de sexo en espermatozoides, Inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Diagnóstico genético. Preimplantación. Citometría de Flujo. Enfermedades genéticas ligadas al sexo. Balance familiar.

SUMMARY

The aim of the study is to perform sperm separation for female gender selection in order to achieve the pregnancy and birth of a baby girl. This procedure was performed for family balancing of a couple with four boys who contracted the aid of EMBRIOS, Hospital de Clínicas Caracas. The X bearing sperm cells were stained with bisbenzimidide and sorted by Flow Citometry with MicroSort technology. The enriched fraction was frozen. Ovulation induction was performed with GnRH agonist and FSH. Nine mature oocytes were injected by Intracitoplasmic Sperm Injection (ICSI) and 2 embryos were transferred to the uterus. Pregnancy and the female sex fetus were confirmed by ultrasound and amniocentesis with the birth of a normal baby girl. This is the first time that sperm separation for gender selection has been successfully performed in Venezuela opening new frontiers for sex selection.

Key words: Sperm separation for gender selection. Intracitoplasmic sperm injection. Preimplantation genetic diagnostic. Flow citometry. X linked genetic diseases. Family balancing.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos se han hecho intentos por escoger el sexo de la descendencia, pero no fue sino hasta los años setenta que la selección de sexo preconcepción se hizo posible. La selección de sexo puede realizarse: antes de la concepción por separación de los espermatozoides, antes del embarazo por la selección de embriones fecundados *in vitro* luego del estudio genético preimplantación, en el embarazo temprano por aborto, luego de la amniocentesis y luego del ultrasonido (1).

Numerosos métodos han sido propuestos para seleccionar espermatozoides portadores del sexo deseado, con una gama de recetas folklóricas que incluyen el momento de las relaciones sexuales, la dieta

y duchas vaginales. Otros métodos, de laboratorio, han sido propuestos, siendo el más conocido el gradiente de albúmina (2), pero la mayoría de estos carece de sustento y evidencias científicas de su efectividad. Luego del desarrollo de la tecnología de separación de espermatozoides por citometría de flujo (MicroSort; Genetics and IVF Institute, Fairfax, VA, EE.UU), la selección de sexo es una realidad y realmente permite la separación de los espermatozoides que producen niña de aquellos que producen varón (3). Esta tecnología fue implementada en bovinos (4) y otras especies desde 1980 y comenzó a aplicarse en humanos a principio de los noventa, y actualmente se realiza un gran estudio clínico para determinar su

seguridad y eficacia (5). Basado en las publicaciones actuales, no se ha demostrado un incremento en la tasa de defectos de nacimiento sobre la tasa esperada para la población general.

El objetivo del presente trabajo es realizar la selección de sexo de espermatozoides portadores del cromosoma sexual femenino, para lograr el embarazo y nacimiento de una niña, para balancear la familia de una pareja.

Caso clínico

La paciente de 36 años y su esposo de 43 años acudieron a EMBRIOS, Centro de Fertilidad y Reproducción Humana del Hospital de Clínicas Caracas, con el objetivo de aumentar las probabilidades de tener una hija. La paciente III gesta. El primer y tercer embarazo de gestación simple, logrados de forma natural, y el segundo, embarazo gemelar, logrado mediante inseminación intrauterina con estimulación ovárica por infertilidad secundaria luego de la primera gesta. Se sugirió realizar la selección de sexo en los espermatozoides, antes de la fecundación, seleccionando los gametos masculinos portadores del cromosoma X por citometría de flujo por la tecnología Microsort.

EMBRIOS es un centro afiliado a Microsort, por lo que estos pacientes fueron referidos para formar parte del protocolo de investigación para esta técnica. A la muestra de semen se le realizó espermatograma con sobrevivencia espermática a la congelación-descongelación, dado que la fracción seleccionada por Microsort es criopreservada para su utilización en técnicas de reproducción asistida. La muestra original del espermatograma realizado en EMBRIOS presentó una concentración de 215 millones/mL con una movilidad total de 56 % y 15% de morfología normal.

Se descartaron en ambos miembros de la pareja HIV; hepatitis B y C. La muestra de semen destinada a la selección de espermatozoides fue centrifugada y teñida con el fluorocromo bisbenzimidida (6). Los espermatozoides fueron sexados por citometría de flujo, seleccionándose por el tipo de fluorescencia que estos emitían y la fracción enriquecida con espermatozoides portadores del cromosoma X, fue congelada en viales. Los viales fueron enviados a nuestra unidad en un tanque de nitrógeno de transporte y almacenados en nuestro banco de semen. La paciente comenzó con dosis diarias de 0,1 mg SC de acetato de leuprolide para supresión pituitaria comenzando en la fase lútea del ciclo anterior, luego se disminuyó la dosis a 0,05 mg desde el día 3 luego de

la menstruación y se continuó diariamente hasta el día de la administración de la hCG. Se comenzó el FSH recombinante (PuregonPen, Organon, Holanda) el día 3 de la menstruación administrado SC. La dosis inicial de FSH recombinante fue de 250 UI/d ajustándola según la respuesta ovárica, el desarrollo folicular, los niveles de E2 y los ultrasonidos transvaginales.

Se administraron 10 000 UI (IM) de gonadotropina coriónica humana (hCG), cuando el folículo dominante alcanzó 18-20 mm de diámetro. Se recuperaron 11 ovocitos bajo la guía de US luego de 36 horas de la administración de hCG. La técnica de reproducción asistida utilizada fue la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Los ovocitos Metafase II fueron diagnosticados luego del tratamiento con hialuronidasa y la observación del cuerpo polar según la clasificación de Veek (7), inyectándose con los espermatozoides descongelados sexados, 9 ovocitos maduros. Se transfirieron dos embriones grado I de 8 células al útero de la paciente (Figura 1). Se administró progesterona IM para soporte lúteo hasta la prueba de embarazo. El embarazo clínico fue diagnosticado por la presencia de un saco gestacional. Se realizó amniocentesis y FISH confirmándose el cariotipo normal femenino (Figura 2 y 3). A las 38 semanas de gestación se realizó una cesárea con el nacimiento de una niña normal de peso 3,050 kg y talla 48 cm.



Figura 1. Dos embriones transferidos de 8 células Grado I.

DISCUSIÓN

En el proceso de separación espermática se diluye la muestra con un colorante fluorescente específico para ADN, bisbenzimidida, que penetra la membrana de la cabeza de los espermatozoides y se une a esta molécula de manera no covalente, sin intercalarse entre las hebras de la doble hélice de ADN. La bisbenzimidida, al parecer no es tóxica para los espermatozoides a



Figura 2. Cariotipo Normal femenino 46 XX. (Cortesía Laboratorio de Pruebas Especiales Centro Médico Docente La Trinidad).

las bajas concentraciones utilizadas. Luego de la preparación y tinción, los espermatozoides vivos son pasados a través del citómetro de flujo acoplado a un rayo láser que causa la fluorescencia del colorante. El citómetro se configura de tal manera que los espermatozoides teñidos son alineados uno detrás del otro, de modo que individualmente cada uno puede ser identificado por la señal fluorescente que emite. La cantidad de fluorescencia es proporcional al colorante unido al ADN, que a su vez está en relación con la cantidad total de ADN en el núcleo (8). Por tanto, se puede realizar la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X que tienen 2,8 % mayor cantidad de ADN que los espermatozoides portadores del cromosoma Y. Los espermatozoides del sexo deseado son desviados electrostáticamente a un tubo recolector y congelados en viales para procedimientos de reproducción asistida (5).

La muestra inicial de semen del paciente presentaba 240 millones de espermatozoides móviles totales y luego de la selección de espermatozoides portadores del cromosoma X, se distribuyó en 2 viales, con una concentración menor a 50 000 espermatozoides/mL. La tasa de recuperación es baja y de una muestra inicial de millones de espermatozoides se obtiene una muestra en el orden de las centenas de mil. Es esta la razón por la que el Instituto de IVF de Fairfax, que patentó el procedimiento, recomienda realizar un ICSI.

Las tasas de embarazo promedio luego de realizar

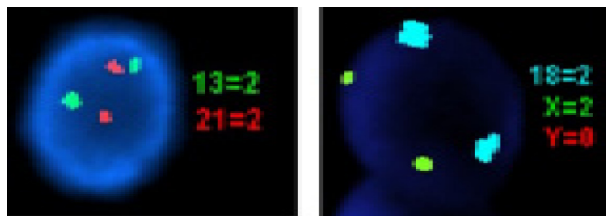


Figura 3. FISH del líquido amniótico con análisis de los cromosomas 13, 21(a) y de los cromosomas 18, X, Y. Se señala la presencia de dos cromosomas X, X de cariotipo femenino (b). (Cortesía Laboratorio de Pruebas Especiales Centro Médico Docente La Trinidad)

una fertilización *in vitro* o ICSI con selección de espermatozoides por citometría de flujo es de 31% por ciclo, lo que coincide con las tasas de embarazo promedio si se aplican estas técnicas de reproducción asistida sin selección (9). La tasa de aborto también es consistente con la esperada para cada rango de edad.

La selección de sexo del futuro hijo usualmente es aceptada si posee una indicación médica, para evitar la transmisión de enfermedades genéticas ligadas al sexo. Tiene una aplicación importante al reducir el riesgo de tener un niño con una enfermedad ligada al cromosoma X, como la hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne y el síndrome de X frágil. Los desórdenes de herencia ligada al sexo, son expresados sólo en los varones, mientras que las hembras son portadoras de la enfermedad, puesto que poseen un alelo normal del otro cromosoma X que la protege. La selección de género preconcepción reduce el chance de tener un varón, que va a sufrir la enfermedad ligada al sexo que generalmente es fatal.

En sus inicios, la selección de sexo en espermatozoides por citometría de flujo, se realizó en pacientes cuyas familias presentaban antecedentes de enfermedades ligadas al sexo, pero este espectro se amplió al balance familiar en parejas que poseen varios hijos de un mismo sexo. Hasta el año 2006 más de 1 000 embarazos han sido logrados por selección de sexo y más de 800 bebés han nacido.

En la actualidad la selección para espermatozoides portadores del cromosoma X es de 90 % y para la selección para espermatozoides portadores del cromosoma Y es de 75 %. De este modo los procedimientos de selección de sexo por citometría de flujo ofrecen una proporción de 9:1 para niña y de 3:1 para varón.

Este procedimiento podría ofrecerse a parejas en combinación con el diagnóstico genético

preimplantación de embriones en casos que haya riesgo de transmisión de una enfermedad genética ligada al sexo. Sin la selección de espermatozoides las mujeres que son portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X van a transmitir la enfermedad al 25 % de sus hijos (la mitad de ellos varones). Si se realiza selección de espermatozoides sólo 10 % de sus hijos van a ser varones y sólo la mitad de ellos o sea 5 % van a estar afectados. Si se realiza PGD luego de seleccionar espermatozoides con cromosoma X, 90 % de los embriones van a ser femeninos (en vez de 50 %) y pueden ser transferidos en intentos para lograr embarazos sin enfermedad (10). Esta alternativa incrementa la probabilidad de lograr un embarazo con un número menor de intentos de FIV. Por esto parece ser una buena opción realizar la selección de sexo en espermatozoides previo a un PGD, cuando el sexo del embrión a transferir también es importante.

En el estudio clínico que se está llevando a cabo los resultados muestran la eficacia y seguridad del método. La tasa de anomalías congénitas en bebés nacidos usando este método coincide con la de nacimientos espontáneos.

En China e India la selección de sexo es ampliamente practicada luego de lograr el embarazo, e incluye el aborto del sexo no deseado, lo cual ha producido un desequilibrio en la proporción de ambos sexos en la población de estos lugares. Dahl mostró datos que soportan que de ser realizada la selección de sexo de espermatozoides, la proporción de cada sexo cambiaría imperceptiblemente (3).

La selección de sexo en espermatozoides ha sido aprobada por diversos comités de ética. En 1994 el Comité de Ética y aspectos de reproducción humana de la FIGO (11) acordó que la selección de sexo antes de la concepción por separación de espermatozoides puede ser justificada en ciertas instancias si no contradice otros valores de la sociedad. Una posición similar asume el Comité de Ética de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) (12) que acepta la selección de sexo en espermatozoides en ausencia de argumentos que sustenten que ésta pueda ser dañina para el niño, la madre o la sociedad.

Esta es la primera vez que se aplica con éxito la selección de sexo de espermatozoides en Venezuela, lo que abre nuevos caminos para que una pareja logre tener un hijo del sexo deseado, ya sea por razones genéticas o sociales.

REFERENCIAS

1. Milliez JM. Sex selection for non-medical purposes. *Ethics, Science and Moral Philosophy of Assisted Human Reproduction*. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:(Suppl.1).
2. Ericsson R, Langevin C, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*. 1973;246:421-424.
3. Dahl E. Preconception gender selection: A threat to the natural sex ratio? *Ethics, Law and Moral Philosophy of Reproductive Biomedicine*. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(Suppl 1):116-118.
4. Cran DG, Cochrane DJ, Johnson LA. Separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. *Theriogenology*. 1994;41:183.
5. Schulman JD, Karabinus DS. Scientific aspects of preconception gender selection. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(Suppl. 1):111-115.
6. Johnson LA, Welch GR, Keyvanfar K, Dorfmann A, Fugger EF, Schulman JD. 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.
7. Veek L. *Atlas of human oocyte and early conceptus*. Baltimore, EE.UU: Waverly Press. 1986.
8. 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.
9. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida*. La Fontecilla. Chile. 2003.
10. Levinson G, Keyvanfar K, Wu JC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, 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.
11. FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health 1994 *Recommendations on ethical issues in obstetrics and gynaecology sex selection*. London.
12. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine *Preconception gender selection for non medical reasons*. *Fertil Steril*. 2001;75:861-864.

Correspondencia: EMBRIOS. Centro de Fertilidad y Reproducción Humana. Hospital de Clínicas Caracas.

Piso 6. Av. Panteón. San Bernardino 1011. Caracas.

embrioslab@cantv.net