

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



Respuesta ovárica a la inyección de plasma autólogo rico en plaquetas en pacientes pobres respondedoras

Por

Dr. Juan David Suárez Moreno

**como requisito parcial para obtener el grado de especialista en
SUBESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA**

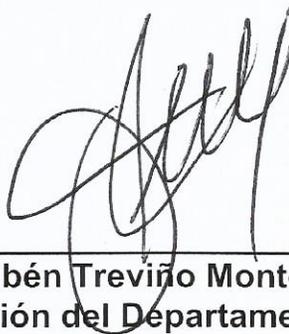
DICIEMBRE, 2024

**Respuesta ovárica a la inyección de plasma autólogo rico en
plaquetas en pacientes pobres respondedoras**

Aprobación de la tesis:



Dr. Luis Humberto Sordia Hernández
Director de la tesis



Dr. Oscar Rubén Treviño Montemayor
Coordinador de investigación del Departamento de Ginecología y
Obstetricia



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Tabla de contenido

Capítulo I. Resumen	6
Capítulo II. Introducción	8
Capítulo III. Justificación	17
Capítulo IV. Planteamiento del problema.....	18
Capítulo V. Hipotesis	19
Capítulo VI. Objetivos	20
Capítulo VII. Materiales y metodos	21
Capítulo VIII. Aspectos eticos	28
Capítulo IX. Resultados	29
Capítulo X. Conclusiones.....	38
Capítulo XI. Bibliografía.....	39

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan especial de mi vida.

A mis padres, hermano y familia, sin el apoyo de ellos nada de esto hubiera sido posible. A mi director de tesis Dr. Luis Humberto Sordia por su orientación y disposición. A mis maestros por sus continuas enseñanzas, Dr. Arturo Morales, Dr. Otto Hugo Valdes, Dra. Cristina Aidé Ramírez.

A la Dra. Selene García Luna su disposición incondicional en la elaboración de este trabajo y especialmente a mis compañeros la Dra Gabriela Rodríguez Segovia y el Dr. Miguel González Jasso por ser un apoyo incondicional durante todo este proceso. Ha sido un tiempo muy especial lleno de aprendizaje.

Gracias a todos

Lista de abreviaturas

AMH	Hormona antimulleriana
βhCG	Hormona gonadotropina coriónica humana, Subunidad β
BMP-15	Proteína morfogenética ósea 15.
Ca²⁺	Calcio.
cAMP	Adenosin Monofosfato Cíclico.
CeUMeR	Centro Universitario de Medicina Reproductiva.
CFA	Conteo folicular antral
E₂	Estradiol.
EOC	Estimulación ovárica controlada.
FIV	Fertilización in vitro.
FSH	Hormona folículo estimulante.
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina.
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoide.
LH	Hormona luteinizante.
O₂	Oxígeno.
P	Progesterona.
PaRP	Plasma autólogo rico en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
PLT	Plaquetas
PG	Prostaglandina.
PRL	Prolactina.
TRA	Técnicas de reproducción asistida

CAPITULO I

RESUMEN

Introducción:

La baja reserva ovárica es un desafío importante en el manejo de la infertilidad, afectando las posibilidades de concepción incluso con técnicas de reproducción asistida, en ese contexto el uso de PaRP, he emergido como una alternativa terapéutica prometedora, dado su potencial para mejorar el microambiente ovárico y estimular la foliculogénesis, mediante la liberación de factores de crecimiento esenciales.

La evidencia sobre los beneficios potenciales del PaRP en baja reserva ovárica se encuentra controvertido, en muchos estudios se ha logrado documentar el incremento en los niveles de HAM y CFA además de la disminución de la FSH, no obstante, en revisiones más recientes muestran que estas mejorías no alcanzan siempre la significancia estadística y que las tasas de implantación y nacidos vivos son variables.

Objetivo:

Evaluar la respuesta ovárica de pacientes con baja respuesta ovárica posterior a la inyección intra ovárica de plasma autólogo rico en plaquetas.

Materiales y métodos:

Se realizó un estudio piloto en el que se incluyeron mujeres con diagnóstico de infertilidad primaria, secundaria o mujeres que deseaban preservar fertilidad, que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CeUMeR) del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Se incluyeron mujeres pacientes pobres responderás del grupo 3 y 4 de acuerdo con los criterios de POSEIDON, con hemoglobina mayor de 11g/dl y plaquetas mayor de 150.000. Se analizo la normalidad de las variables con el test de Shapiro-Wilk, la comparación de los grupos se realizó con una prueba de T pareada en los casos donde las variables tuvieron una distribución normal y con una prueba del Wilcoxon en los casos con distribución no normal y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con la clave de registro PI23-00196.

Resultados:

En este estudio piloto se incluyeron 18 pacientes, de las cuales 7 completaron el protocolo establecido, la edad promedio de las pacientes que completaron el seguimiento fue de 35.8 ± 3.5 años y el IMC promedio fue de 26.7 ± 6.0 kg/m², y los niveles de hemoglobina fueron de 12.9 ± 1.1 , el valor promedio de FSH previo a la aplicación de PaRP intraovarico fue de 13.50 ± 7.35 con valor posterior de 14.25 ± 6.62 con p: 0.64, HAM pre 0.25 ± 0.22 y post 0.36 ± 0.26 con p: 0.25, CFA pre 3.17 ± 1.7 y post 4 ± 2.8 con p: 0.70 y Ovocitos MII pre 1.0 (0.74-1.75) y post 2.5 (2-4.5) con una p: 0.06, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los valores hormonales de FSH, HAM y CFA previo a la inyección de PaRP intraovarico.

Se documento un embarazo espontaneo es una paciente de 40 años diagnosticada con infertilidad secundaria de más de 15 años de evolución, sin embargo, esta gestación no se logro satisfactoriamente terminando en un aborto en semana 10, destaca este evento de forma relevante como una posible respuesta inicial al tratamiento.

Conclusiones:

En este estudio piloto, la inyección intraovárica de plasma autólogo rico en plaquetas en mujeres con baja reserva ovárica no mostró una mejoría estadísticamente significativa en parámetros de función ovárica, hormona antimulleriana (AMH), Hormona folículo estimulante (FSH), conteo folicular Antral (CFA) y ovocitos MII (metafase II). Sin embargo, se observó una tendencia a la mejoría en casos individualizados.

Palabras clave: Plasma autólogo rico en plaquetas, Hormona Antimulleriana, Pobre respondedoras.

CAPITULO II

Introducción

A partir de la década de 1980 se describió una edad materna mayor de 35 años como 'avanzada', término que en la actualidad continúa empleándose de forma sistemática, dado que este grupo de pacientes tiene un riesgo aumentado de presentar complicaciones obstétricas, entre las que destacan, la pérdida del embarazo, las anomalías fetales principalmente síndrome de Down, mortinato e infertilidad. En los últimos años se ha visto un aumento en la edad materna promedio por diferentes razones, entre las que destacan, los cambios sociales y culturales, donde muchas mujeres retrasan la maternidad para completar sus estudios superiores y establecerse profesionalmente, además de que en la actualidad existe una mayor aceptación de tener hijos más tarde, lo que reduce la presión social para tenerlos más jóvenes¹.

Dado que la fertilidad en las mujeres disminuye a medida que avanza la edad, se sabe que a partir de los 32 años se presenta una disminución de la calidad y cantidad de ovocitos, esta empeora luego de los 37 años y además, se calcula que el 10% de las mujeres pueden tener riesgo de infertilidad inexplicable durante esta década de la vida², lo cual da como resultado una mayor demanda de servicios de TRA, Las TRA han permitido que mujeres logren la concepción a edades más avanzadas, superando las limitaciones biológicas asociadas al envejecimiento reproductivo³.

dado que las mujeres tienen un número finito de óvulos que cuando llega a umbrales críticos, estas pierden la capacidad para responder a estímulos hormonales y secretar hormonas estableciéndose así una relación con la infertilidad femenina, pudiendo experimentar una pobre respuesta a la estimulación o una insuficiencia ovárica precoz, la cual se presenta en alrededor del 9 al 24% de las mujeres que se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA)⁴.

Con el objetivo de aumentar la cohorte de folículos se han evaluado diversos tratamientos, entre los que destacan la dehidroepiandrosterona (DHEA) y/o la testosterona, además se han incorporado otros coadyuvantes como la hormona del crecimiento y factores de crecimiento similar a la insulina factor tipo 1 (IGF-1), los cuales tienen un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo folicular, estos enfoques buscan optimizar la calidad ovárica y aumentar las posibilidades de éxito en TRA, Sin embargo estas terapias no afectan directamente a los ovocitos en desarrollo, sino que están dirigidas a las células de la granulosa y del cúmulo

de la granulosa que son esenciales para mantener el desarrollo de los ovocitos, por lo que aún no se ha establecido si existe un tratamiento para restaurar la reserva ovárica *per se*⁵.

En los últimos años han surgido nuevas técnicas de restauración ovárica como la inyección de plasma autólogo rico en plaquetas (PaRP), que están siendo probados para maximizar la función ovárica y creando así un potencial tratamiento que puede ser beneficiosa para pacientes infértiles o subfértiles. Su principio biológico yace en que el plasma rico en plaquetas (PRP) contiene diferentes tipos de sustancias como: factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante, angiogénesis derivada de plaquetas y varias interleucinas, estos factores de crecimiento indefinidos liberados, podrían inducir la transformación de células madre de línea germinal en folículos primordiales, y por lo tanto reponer un número o grupos de folículos ováricos, además de favorecer la neovascularización ovárica universal⁶.

Antecedentes

El objetivo de las TRA es la concepción que culmina con un nacido vivo sano, en un tiempo adecuado y con costos reducidos⁷. La estimulación ovárica juega un papel central en el éxito de los ciclos de fertilización *in vitro* (FIV), estos se basan en un protocolo en el que se estimulan los ovarios con gonadotropinas y/o otros compuestos farmacológicos, con la intención de incrementar el número de ovocitos a reclutar y desarrollar múltiples folículos dominantes, que permitan la obtención de múltiples ovocitos en metafase II (MII), que den lugar a un número adecuado de embriones con potencial para transferirse al vientre materno. En general se considera que entre 10 y 15 ovocitos es la respuesta ovárica óptima, después de la estimulación ovárica^{8,9}.

Aun con la existencia de las TRA, el tratamiento de las pacientes con pobre respuesta ovárica, se considera un desafío importante en el campo de la biología reproductiva. Este grupo de pacientes, son un reto para el biólogo de la reproducción, ya que es muy probable que no se obtenga el número adecuado de ovocitos después de la estimulación ovárica, lo que se traduce en una menor probabilidad de embarazo, además tiene un mayor porcentaje de riesgo de cancelación de ciclo¹⁰ y una menor tasa de nacidos vivos, como lo describe: Polyzos et al¹¹. Y Busnelli et al¹², donde informaron nacimientos en pobres respondedoras cercanos al 6%.

Hace más de 30 años se describió el primer caso de una paciente con pobre respuesta ovárica, está, se evaluó por una disminución en los niveles de estradiol y una respuesta folicular disminuida, luego de un ciclo de estimulación ovárica¹³. Desde entonces existen cientos de publicaciones sobre la pobre respuesta ovárica, sin embargo, la mayoría de las revisiones no eran concluyentes, lo que impedía evaluar o desarrollar cualquier protocolo para mejorar resultados. Es por esto que en 2011 la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) presentó un consenso que definió la 'pobre respuesta ovárica' basado en una serie de criterios mínimos necesarios para describir una pobre respondedora¹⁴. El diagnóstico se confirma, si presenta al menos 2 de los siguientes criterios:

- ✓ Edad materna avanzada (≥ 40 años) o cualquier otro factor de riesgo para pobre respuesta ovárica.
- ✓ Una pobre respuesta ovárica previa (≤ 3 ovocitos con protocolo de estimulación convencional).
- ✓ Una prueba de reserva ovárica anormal (es decir, CFA $< 5-7$ folículos o hormona antimülleriana (AMH) $< 0.5-1.1$ ng/ml).

Si no cumple con los criterios de edad materna o reserva ovárica anormal, una paciente puede clasificarse como pobre respondedora si tiene 2 ciclos de estimulación ovárica máxima con respuesta deficiente¹⁰. No obstante, la clasificación de la ESHRE ha sido criticada, especialmente por la falta de claridad en la definición de los factores de riesgo y la ausencia de consideración en la calidad de los ovocitos, tampoco brinda recomendaciones para la toma de decisiones clínicas ni el asesoramiento o manejo de la paciente pobre respondedora^{10,14}.

Por lo que se creó la clasificación de POSEIDON (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), este tiene como objetivo mejorar la eficiencia y el éxito del tratamiento, al permitir una mejor selección y personalización del protocolo de estimulación ovárica y la transferencia embrionaria. En términos prácticos, estratifica a las pacientes en 2 grupos principales, la pobre respondedora inesperada y la pobre respondedora esperada, que pertenecen a los grupos 1-2 y 3-4 respectivamente⁹.

Para definir los criterios de POSEIDON se toman en cuenta 4 factores principales:

- ✓ Edad de la paciente: factor importante a considerar en el tratamiento de TRA

- ✓ Respuesta ovárica previa: proporciona información útil respecto al número y calidad de óvulos que puede producir cada paciente
- ✓ Numero de óvulos recuperados: POSEIDON tiene en cuenta el número de óvulos recuperados y establece subgrupos en función de estos.
- ✓ Biomarcadores hormonales: valora HAM y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales brindan información de la reserva ovárica y la capacidad de respuesta ovárica del paciente.

La combinación de estos factores permite la clasificación de pacientes en cuatro subgrupos, cada uno con características ováricas y de respuesta específica, que se utilizan y adaptan para protocolos de tratamiento, con el objetivo de mejorar la eficiencia y el éxito de los mismos ¹⁰.

La disminución de la reserva ovárica junto a la mala calidad de los ovocitos genera un fuerte compromiso en el estado de fertilidad de estas pacientes independientemente de la edad, por lo que las opciones de tratamiento de estas pacientes incluyen: FIV, donación de ovocitos, gestación subrogada o adopción. Sin embargo, en los últimos años se han abordado alternativas con el objetivo de mejorar o revertir el deterioro hormonal de esta manera permitir la producción de gametos de buena calidad, es aquí donde el PRP toma protagonismo ¹⁵.

La aplicación de PRP refleja un avance innovador con resultados prometedores. El PRP también conocido como factores de crecimiento rico en plaquetas (FCRP), matriz de fibrina rica en plaquetas (MFRP) o concentrado de plaquetas, fue descrito inicialmente en la década de 1970, en el campo de la hematología, donde se describió un recuento de plaquetas superior al de la sangre periférica, inicialmente se utilizó como producto para el tratamiento de pacientes con trombocitopenias ¹⁶.

Hacia 1980 en la búsqueda de nuevas técnicas de regeneración ósea y herramientas de homeostasis, llevo al uso de MFRP en el campo de la cirugía maxilofacial¹⁶. Desde entonces se ha aplicado en múltiples campos, incluyendo la cirugía pediátrica, la cirugía cardíaca, la ginecología, urología, oftalmología entre otros. Sin embargo, es en el campo de la ortopedia y la cirugía plástica donde ha aumentado el uso de PRP para múltiples patologías, esto último, motivado en gran parte debido al interés comercial generado por el deporte profesional y por la estética respectivamente¹⁷.

Plasma rico en plaquetas

El PRP se define como una fracción de plasma que contiene una concentración superior de plaquetas a la del plasma en condiciones basales, además de una alta concentración de factores de crecimiento que son secretados continuamente y activamente por las plaquetas¹⁸.

Junto al advenimiento del estudio de las bases bioquímicas para contrarrestar los procesos celulares del envejecimiento se encontró que el PRP, por sus propiedades estimuladoras y moduladoras de la proliferación celular principalmente de células madre de origen mesenquimal tipo: fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, células epiteliales, adipoblastos, miocitos, y condrocitos, jugaban un papel importante en los procesos de rejuvenecimiento tisular¹⁸.

La aplicación de PRP tiene su origen en algunas especialidades de la medicina, donde se buscaba mejorar la cicatrización de las heridas quirúrgicas y las heridas recalcitrantes, sin embargo, actualmente el uso de esta terapia se ha extendido a todos los campos de la medicina, muchos de ellos con tratamientos novedosos y otros aun en un ámbito experimental, aun hoy en día se desconocen en su totalidad los procesos biológicos de la regeneración tisular sin embargo se sabe que las plaquetas, juegan un papel importante en estos mismos¹⁹.

Mecanismo de acción del PRP

Las plaquetas contienen gránulos los cuales a su vez, contienen numerosas sustancias que son determinantes en los procesos de cicatrización e inmunomodulación tisular, en ellas sobresalen: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (que incluye los isómeros $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, y $\alpha\beta$), el factor de crecimiento transformante (TGF)- β (que incluye los isómeros $\beta1$ y $\beta2$), el factor plaquetario 4 (PF4), la interleucina (IL)-1, el factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PDEGF), el factor de crecimiento de células epiteliales (ECGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la osteocalcina, la osteoconectina, el fibrinógeno, la fibronectina y la trombospondina (TSP)-1, los cuales son componentes de las familias de los factores de crecimiento, estas últimas secretadas en su mayoría por los gránulos α^{17} (Tabla 1).

Tabla 1. Función de las moléculas plaquetarias involucradas en el proceso de reparación tisular.

Molécula	Funciones
----------	-----------

PDGF	Estimula la síntesis de proteínas, induce la quimiotaxis, estimula producción de IGF-1, y estimula la angiogénesis.
VEGF	Mayor inductor-regulador de angiogénesis, favorece crecimiento de folículos capilares.
FGF	Estimula la re-epitelización, estimulador de angiogénesis (actividad quimiotáctica sobre células endoteliales), formación del tejido de granulación, acelera la regeneración.
HGF	Regula el ciclo celular, estimula la reparación epitelial, la formación de tejido de granulación y angiogénico.
IGF-1	Estimula la proliferación de células mesenquimales y de revestimiento, diferenciación celular y síntesis de colágeno (estimulación de osteoblastos).
EGF	Mitógeno, pro apoptótico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos.
TGF- β	Induce la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de células mesenquimales, síntesis de colágeno por los osteoblastos.
PF4	Estimula la inflamación, interviene en la hemostasis.
PDAF, PDEGF y ECGF	Promueven la angiogénesis.
IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- α	Proinflamatorios / Antiinflamatorios.
Fibrinógeno, vitronectina, Fibronectina, Factor von Willebrand y trombospondin	Participan en la formación del trombo, estimulan la adhesión de células y promueven la mitosis.

PDGF: Platelet Derived Growth Factor - VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor – FGF: Fibroblast Growth Factor – HGF: Hepatocyte growth factor - IGF-1: insulin-like growth factor 1 – EGF: Epidermal Growth Factor – PF4: Platelet Factor 4 – IL: Interleukin – TNF α : Tumor necrosis factor.

Una vez el tejido envía señales de activación plaquetaria, estas entran en un proceso de desgranulación, lo cual permite a los gránulos α iniciar un proceso de integración con la membrana celular plaquetaria, activando proteínas secretoras y fusionando con cadenas de carbohidratos, de esta manera se permite la activación de receptores transmembranales y el inicio de la señalización intracelular en diferentes células diana, que ejercerá su acción dependiendo de la estirpe celular a la cual pertenezca¹⁸.

Los factores de crecimiento son sustancias de naturaleza peptídica, que tienen como función la comunicación intercelular por medio de señalización química, inicialmente son sintetizados en forma de precursores siendo necesario para la liberación en forma activa del factor un proceso de proteólisis, el cual genera la molécula activa que debe interactuar con su receptor para que por medio de un sistema de segundos mensajeros, estimulen una cascada de señales que

terminaran en la activación de uno o varios genes. Pueden interferir directamente en procesos biológicos celulares, dado que intervienen directamente en la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular, e incluso la apoptosis. Sin embargo, el principal proceso regulado por los factores de crecimiento es el control externo del ciclo celular, regulando la activación de la fase G0 y favoreciendo a la célula, al ingreso a la fase G1, además regulando la síntesis proteica y favoreciendo el crecimiento celular^{17,18,20}.

El PRP actúa sobre los tejidos mesenquimales, aunque no de forma exclusiva sobre este, recordando que el tejido mesenquimal procede del mesodermo y de este el origen de un número importante de órganos como el músculo liso, mesotelio, el sistema linfático, tejido conectivo, sistema cardiovascular entre otros, además, también proporciona el estroma de muchos órganos, el cual se caracteriza por poseer una gran cantidad de células madre pluripotenciales¹⁸.

La concentración de plaquetas es una de las principales variables a considerar para lograr un efecto óptimo. Sin embargo, no se ha establecido un valor normal internacionalmente. Se sabe que las concentraciones que un individuo necesita para lograr un efecto beneficioso pueden variar en comparación a otro individuo, es por esto que las concentraciones pueden oscilar de 2 hasta 8.5 veces el valor normal^{20,16,19,2}.

Técnica para obtención del PRP

El PRP se obtiene a partir de sangre autóloga mediante un proceso basado en la centrifugación diferencial, que permite separar las distintas fases sanguíneas y seleccionar aquella de interés. Este procedimiento, generalmente realizado en un laboratorio, se centra en la obtención de plaquetas con una concentración y calidad óptimas, asegurando su efectividad para aplicaciones terapéuticas.

En general, este inicia con la extracción sanguínea de una vena periférica del antebrazo, antes de comenzar la cirugía, la cual se almacenará inmediatamente en un tubo con 3 ml de anticoagulante de citrato ácido de dextrosa (CAD), el cual evita la activación plaquetaria, el citrato secuestrando calcio y bloqueando la cascada de la coagulación y la dextrosa manteniendo viables las plaquetas^{21,22}.

El centrifugado es un paso fundamental para conseguir la máxima concentración de plaquetas por unidad de volumen, sin ruptura de estas. Deben realizarse en condiciones controladas de tiempo y velocidad debido a que la variación en estas, pudieran ocasionar un daño en las diferentes líneas celulares. Los protocolos además varían con el número de veces que se centrifuga, pudiendo ser, única o doble centrifugación² Se conocen distintos protocolos que se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de protocolos de obtención de PRP.

Protocolo	Centrifugado 1	Centrifugado 2
Curasan Kit	10 min /2.400 rpm	15 min /3,600 rpm
Smart PreP	6 min /5,600 rpm	6 min /2,400 rpm
Friadent-Schutze	10 min /2.400 rpm	15 min /3,600 rpm
PCCSsystem	3.45 min /3.000 rpm	13 min / 3,000 rpm
PRGF	7 min /1,400 rpm	

Cuando se centrifuga la sangre forma 3 capas, las cuales se organizan dependiendo de la densidad de los componentes. La capa inferior, compuesta principalmente de glóbulos rojos seguido de una capa media, compuesta por glóbulos blancos y plaquetas y una capa superior compuesta por plasma. Esta última se divide en 3 subunidades, la más superficial es una subunidad pobre en plaquetas, la subunidad intermedia con una concentración intermedia de plaquetas y la subunidad inferior la cual es una subunidad rica en plaquetas, cabe destacar que las concentraciones de factores de crecimiento no están directamente relacionadas a las concentraciones de plaquetas. Lo anterior, dado a que la variabilidad celular en los diferentes individuos la cual condiciona la producción y almacenamiento de estos factores. Por lo que se justifica aún más, que para un grupo de individuos se necesiten diferentes concentraciones de plaquetas, por otra parte podemos decir que los niveles de factores de crecimiento no varían de acuerdo al sexo o la edad, sin embargo en el proceso de estandarización solo tuvimos voluntarias femeninas²⁰.

Activación del plasma rico en plaquetas

La activación plaquetaria es un procedimiento de gran frecuencia en el área de la medicina regenerativa, a pesar de contar con diversos protocolos para la activación plaquetaria, los procesos carecen de una estandarización adecuada donde se logre obtener concentraciones y una cinética de liberación de factores de crecimiento similares. Para llevar a cabo la activación del PRP se puede hacer por distintas vías, una de ellas es la adición de trombina exógena, sin embargo, la principal limitante de la trombina exógena, en que esta produce la liberación inmediata de citocinas, como resultado la activación inmediata de sus gránulos α , es por esto que se han implementado y estudiado otros compuestos para la activación del PRP, como el cloruro calcio a 22.8 mM, la concentración final que se obtiene cuando se adicionan 50 μ L de cloruro de calcio al 10% por mL de plasma del paciente, y luego se espera entre 8 a 15 minutos²³.

Una vez activada la plaqueta expresa receptores que favorecen la liberación de los diferentes factores de crecimiento que participan en las etapas posteriores del proceso de cicatrización.



Figura 1. Plaqueta activada a nivel coronario humano; por John W. Weisel 2008, departamento de biología celular desarrollada, universidad de Pensilvania.

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN

El PaRP ha demostrado ser un importante regulador de procesos de cicatrización e inmunomodulación celular por medio de distintos mecanismos fisiopatológicos, donde sobresalen, la sobreexpresión de distintas sustancias que van a favorecer el crecimiento y reparación tisular. Estos procesos van a tener impacto sobre los distintos tejidos derivados del mesénquima embrionaria, donde, los ovarios estarán directamente beneficiados, luego de que se presente el envejecimiento o la disfunción por distintas causas de este tejido, el PaRP podría favorecer a una reversión del proceso nocivo de tal forma impactaría directamente sobre la calidad ovocitaria y la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida.

En los últimos años, el manejo de las pacientes con mala respuesta ovárica sigue siendo un desafío, en la tecnología moderna de reproducción asistida, se han implementado protocolos de estimulación ovárica controlada que junto a la adición de adyuvantes antes o durante los ciclos estimulados, muestran resultados alentadores, el PaRP dado su mecanismo de acción, tiene un potencial beneficio a nivel ovárico ²⁴.

Publicaciones recientes han mostrado que el PRP ha surgido como un tratamiento prometedor para aumentar la fertilidad en la mujer con pobre respuesta a ciclos de estimulación ovárica. Por lo que el objetivo de este estudio será valorar la respuesta ovárica (niveles de FSH, HAM, CFA, número de ovocitos MII recuperados y de embriones) posterior a la inyección intra ovárica de PRP en pacientes con baja respuesta ovárica documentada en un ciclo previo.

Sin embargo, no existe suficiente evidencia del efecto del PaRP sobre los niveles de FSH, HAM, recuento folicular antral y de los resultados reproductivos destacando la calidad ovocitaria. Un potencial efecto positivo del uso de PaRP, favoreciendo como coadyuvante a un grupo seleccionado de pacientes que tienen un pronóstico limitado, generando así, una probabilidad de éxito.

CAPITULO IV

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las tendencias a nivel mundial y en México apuntan a una alta prevalencia de infertilidad y una disminución en la calidad ovárica por factores como la edad materna avanzada, y otras asociadas al estilo de vida, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan lograr mayores tasas de embarazo.

La evidencia disponible indica que el PRP podría ser una potencial estrategia para mejorar la respuesta ovárica (los niveles de FSH, HAM, el conteo folicular antral y el número de ovocitos recuperados). Por lo que es importante evaluar el PRP en CeUMeR.

Con lo que surgió la pregunta de investigación.

¿Puede la inyección intraovarica de PaRP mejorar la respuesta ovárica en pobre respondedoras?

CAPITULO V

HIPÓTESIS

Hipótesis nula

La respuesta ovárica (FSH, HAM, CFA y número de MII recuperados) en pacientes pobres respondedoras después de la inyección de PaRP, es igual a la obtenida en el ciclo previo.

Hipótesis alternativa

La respuesta ovárica (FSH, HAM, CFA y número de MII recuperados) en pacientes pobres respondedoras después de la inyección de PaRP es mayor a la obtenida en el ciclo previo.

CAPITULO VI

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la respuesta ovárica de pacientes con baja respuesta ovárica posterior a la inyección intra ovárica de plasma autólogo rico en plaquetas.

Objetivos específicos:

- Estandarizar el protocolo de obtención de PaRP.
- Comparar los niveles hormonales de FSH al inicio de la estimulación ovárica del ciclo post-inyección intraovárica de PaRP con los del ciclo basal.
- Comparar la reserva ovárica mediante CFA y niveles de HAM previos y posteriores a la inyección intraovárica de PaRP.
- Comparar el número de ovocitos metafase II obtenidos en el ciclo previo vs el ciclo posterior a la inyección de PRP.

CAPITULO VII

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio piloto en el que se incluyeron mujeres con diagnóstico de baja reserva ovárica, las cuales cursaban con infertilidad primaria, secundaria o deseo de preservación de la fertilidad, y que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CeUMeR), del Hospital Universitario “ Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el periodo de Mayo 2023 a Diciembre 2024, que se sometieron a tratamientos de fertilidad con técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV-ICSI). Se incluyeron mujeres que consultaron por infertilidad que cumplían los criterios de inclusión, pacientes del grupo 3 y 4 de acuerdo con los criterios de POSEIDON, niveles de hemoglobina \geq a 11g/dl, niveles de plaquetas \geq a 150,000 m/l, se excluyeron las pacientes con falla renal crónica o enfermedad hematológica activa (Recuento de plaquetas \leq a 150,000).

Reclutamiento

El reclutamiento de pacientes se desarrolló durante la consulta de CeUMeR, se identificaron aquellas pacientes que cumplían con los criterios establecidos para clasificarse como pobres respondedoras, de acuerdo con los parámetros clínicos y de laboratorio. Estas pacientes fueron invitadas a participar en el protocolo de investigación, se explicó detalladamente el propósito y los procedimientos del estudio. Se proporcionó a cada paciente un formato de consentimiento informado, garantizando que tuvieran el tiempo necesario para su lectura y comprensión, además de responder cualquier pregunta que surgiera. Una vez que la paciente expresó su conformidad, se procedió a obtener su firma en el formato de consentimiento informado, formalizando así su participación en el estudio.

Las pacientes seleccionadas se sometieron a un ciclo de estimulación ovárica controlada y punción folicular, siguiendo los protocolos estándar del CeUMeR. Como parte de las mediciones basales, se realizaron análisis hormonales (FSH y AMH) y un conteo de folículos antrales (CFA) durante los días 1 a 3 del ciclo menstrual. Estos datos iniciales permitieron establecer un punto de referencia para evaluar los efectos posteriores de la intervención.

Previo a la realización de la punción folicular, se extrajeron ~ 30 mL de sangre del antebrazo izquierdo de la paciente. Para garantizar la calidad de la muestra, la sangre se recolectó en tubo

de solución ACD de vidrio vacutainer™ con anticoagulante de citrato ácido de dextrosa (tapón amarillo), evitando así la activación plaquetaria prematura. Esta sangre fue inmediatamente procesada para la obtención del PaRP.

Tras la aplicación, se esperó de 1 a 3 ciclos para siguiente ciclo de estimulación y mediciones hormonales, durante el cual se llevó a cabo un segundo ciclo de estimulación ovárica controlada, siguiendo exactamente el mismo protocolo de estimulación utilizado previamente. Se repitieron las mediciones hormonales (FSH y AMH) y el CFA entre los días 1 a 3 del ciclo para comparar los resultados con los datos previos a la aplicación del PRP.

Estandarización para la obtención del PRP

En una primera etapa, contamos con la valiosa colaboración de un grupo de voluntarias de la institución, quienes ofrecieron su participación en el proceso de estandarización, facilitando la extracción de sangre para el desarrollo del protocolo.

Se investigó y se estudiaron diferentes protocolos, sin embargo, el descrito por el Dr. D.H. Barad y colaboradores, aseguraba su calidad, efectividad y reproducibilidad, a continuación, se describen los pasos del procedimiento:

Inicialmente, se obtienen seis tubos de solución ADC de vidrio Vacutainer™, cada uno con un volumen de 9 ml. Posteriormente, se realiza una centrifugación inicial a 2000 RPM durante cinco minutos, tras lo cual el plasma es transferido a dos tubos cónicos de 15 ml, los tubos con plasma son sometidos a una segunda centrifugación a 3200 RPM durante tres minutos. Después de este proceso, se extrae el plasma cuidadosamente hasta dejar un pellet, ajustando un volumen final de 3.5 ml en cada tubo Falcon.

Para la cuantificación plaquetaria, se toma 1 ml de plasma y se transfiere a un tubo rojo sin aditivos. Al plasma restante, se le agrega gluconato de calcio 0.15:1ml por cada mililitro de PRP para activarlo. Se permite la formación de un coágulo durante 8 a 10 minutos, agitando intermitentemente.

Finalmente, se realiza una última centrifugación a 3000 RPM durante 5 a 8 minutos, separando el plasma activado, que queda listo para su aplicación.

Se realizó un análisis detallado de las limitaciones encontradas durante la preparación del PaRP según el protocolo previamente descrito, así como las soluciones implementadas para optimizar el procedimiento. Este enfoque busca garantizar una preparación más eficiente, segura, efectiva y reproducible del PRP para aplicaciones clínicas.

Limitaciones Identificadas

Durante la preparación del PRP, enfrentamos varios desafíos que comprometían tanto la comodidad del paciente como la calidad del producto final. Entre estas limitaciones destacan las siguientes:

1. Tiempo prolongado para la extracción de sangre: Completar los 6 tubos, tomaba más de 30 minutos, generando inconvenientes logísticos, afectando eficiencia en la elaboración y aplicación.
2. Mayor número de pinchazos en la piel: el sistema de extracción gota a gota, en ocasiones requería múltiples venopunciones, lo que incrementaba incomodidad para la paciente y molestias.
3. Disminución del conteo plaquetario final por retención del pellet: Dejar el pellet de glóbulos blancos y plaquetas en el tubo tras la centrifugación afectaba negativamente la concentración final de plaquetas.
4. Formación de coágulos: La falta de mezcla continua durante el proceso de activación favorecía la formación de un coágulo, esto dificultaba la separación del plasma activado, prolongaba el tiempo del procedimiento y comprometía la calidad del PRP.

Soluciones Implementadas

Con el objetivo de superar estas limitaciones, se introdujeron varias modificaciones al protocolo inicial. Estas mejoras fueron diseñadas para optimizar el proceso, minimizar la incomodidad del paciente y maximizar la calidad del PRP obtenido:

1. Reducción del número de tubos necesarios: Se decidió disminuir el número de tubos utilizados durante la extracción de sangre. Este cambio se implementó sin comprometer el volumen final requerido para la aplicación del PaRP, ajustando el protocolo para concentrar más eficientemente las plaquetas en menos tubos.
2. Aumento en el tiempo de centrifugación: Se ajustaron los parámetros de centrifugación, incrementando el tiempo para concentrar el conteo plaquetario en el sedimento de manera más efectiva. Este cambio contribuyó a obtener un producto final con una mayor densidad de plaquetas, mejorando su potencial terapéutico.
3. Remoción del pellet de sedimento tras la centrifugación: Con el fin de mantener los niveles óptimos de plaquetas en el PaRP, se estableció la

remoción del pellet de glóbulos blancos tras la primera centrifugación. Aseguro una mayor concentración de plaquetas en el producto final. Adicionalmente, se valoró la concentración plaquetaria en esta etapa para garantizar que los niveles alcanzaran los parámetros adecuados.

4. Mezcla continua durante la activación plaquetaria: Para evitar la formación de coágulos organizados y facilitar la separación del plasma activado, se implementó una técnica de mezcla continua durante el proceso de activación. Este enfoque permitió una distribución uniforme de las plaquetas activadas y una mayor organización del coágulo, lo que facilitó su manipulación y mejoró la calidad del PaRP.

Resultados y Beneficios Observados

Tras la implementación de estas soluciones, se observaron mejoras significativas en varios aspectos del procedimiento:

- Mayor comodidad de la paciente
- Optimización del conteo plaquetario
- Eficiencia
- Calidad del PaRP

Protocolo para la obtención del PRP

Posterior a la estandarización (ver sección de resultados) Se estableció el siguiente protocolo como el que se empleó para el estudio, En primer lugar, se obtuvo sangre por venopunción y se colectó en tres tubos de solución ADC de vidrio Vacutainer™, se mezclaron por inversión para asegurar la mezcla homogénea. Posteriormente para separar los elementos formes de la sangre, se centrifugaron a 3200 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos en la centrifuga Thermo Scientific™, Medifuge™. Una vez concluida la centrifugación, el plasma fue cuidadosamente transferido a dos tubos cónicos de 15 ml.

Posteriormente, se sometieron a una segunda centrifugación a 2000 RPM durante 5 minutos. Al finalizar este proceso, se descartó el plasma del sobrenadante hasta dejar aproximadamente 3.5 ml de plasma incluyendo la capa de glóbulos blancos y limitando la extracción de glóbulos rojos. Se ajustó un volumen final de 3.5 ml en cada tubo Falcon, para tener un volumen de 7ml, la mezcla obtenida se re suspendió y se tomó una alícuota de 1 ml de plasma y se transfirió a un

tubo rojo sin aditivos, para la cuantificación de plaquetas. Este paso permitió verificar la calidad del PRP obtenido antes de proceder con su activación.

Se procedió a la activación plaquetaria, la cual se llevó a cabo agregando gluconato de calcio a una proporción 0.15:1ml. Se permitió la formación de coágulo mientras se mezclaba continuamente para evitar la adherencia a las paredes del tubo, que dificulten la extracción del plasma activado. Este medio estimula la liberación de factores de crecimiento, esenciales para las aplicaciones clínicas del PRP. Durante el proceso de activación, se permitió la formación de un coágulo, manteniendo una mezcla continua durante 8 a 10 minutos para garantizar una distribución uniforme y prevenir la formación de estructuras organizadas que dificulten el manejo posterior (extracción).

Finalmente, el PRP activado fue sometido a una última centrifugación a 3000 RPM durante 5 a 8 minutos. Esto permitió la separación del plasma activo, para su aplicación.

Aplicación del plasma

La aplicación, se realizó después de realizar la aspiración folicular, mediante una guía ecográfica transvaginal, una vez la paciente se encuentre sedada o bajo anestesia general según sea el caso, se introduce un transductor ecográfico endocavitario con una aguja acoplada a través de la vagina hasta llegar a los ovarios.

Bajo visualización directa se localizan los ovarios recién aspirados, y con la aguja conectada a un sistema de doble vía, y con el plasma cargado en una jeringa de 10 cm³, se introduce cuidadosamente la aguja en la corteza de cada ovario, posteriormente se aplica presión positiva aplicando 2.5cm³ de plasma en 4 punciones a la corteza ovárica figura 2a, 2b, 2c.

Posteriormente se repite el procedimiento en el ovario contralateral, durante este procedimiento se evalúa continuamente la posición de los ovarios para lograr una aplicación completa y segura, minimizando movimientos bruscos para evitar lesiones en estructuras cercanas como vasos sanguíneos o intestinos.

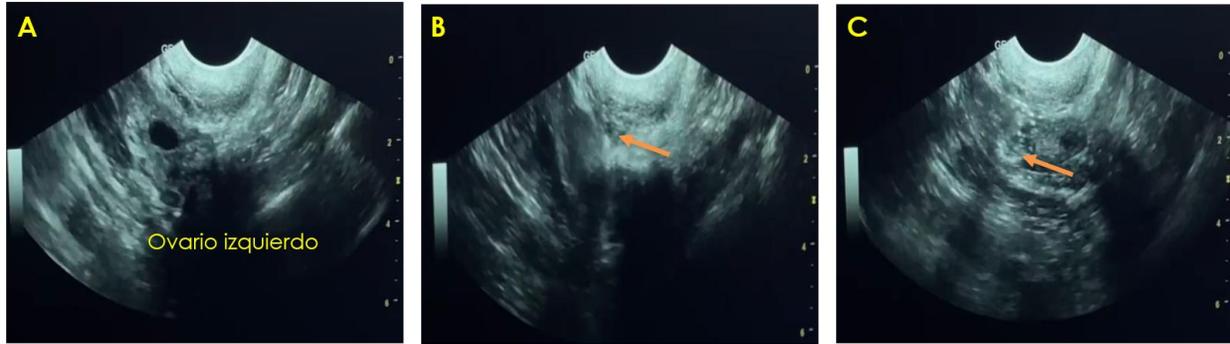


Figura 2: Secuencia en la aplicación de PaRP (A): Ovario izquierdo por vía ultrasonográfica intravaginal, con transductor de 10mHz, en posición para realizar la punción y administrar el PRP (B): ilustra la aguja de aspiración folicular de 12G*25', con sistema de doble luz, ingresando a la corteza ovarica (flecha) (C): Se observa el push de instilación de PRP en la corteza ovarica.

Es importante destacar que la aplicación de todos los PaRP en este protocolo fue realizada por un único operador. Esto aseguró la estandarización del procedimiento, evitando variaciones en la técnica de aplicación que pudieran influir en los resultados. Al mantener la consistencia en la ejecución, se garantiza mayor rigor en el estudio y se refuerza la validez de los hallazgos obtenidos, permitiendo atribuir los efectos observados exclusivamente al tratamiento y no a diferencias en la técnica empleada.

Tras la aplicación del plasma la paciente continua con el protocolo institucional de recuperación post aspiración folicular, se vigilan efectos adversos de la anestesia, complicaciones como dolor pélvico, sangrado vaginal entre otras.

Cálculo del tamaño de muestra:

Dado que existe información limitada con respecto a la aplicación del PaRP en pacientes con baja respuesta ovárica en el contexto de infertilidad, se llevó a cabo un estudio piloto con el objetivo de explorar los resultados de la aplicación de este mismo u obtener datos preliminares que puedan guiar investigaciones futuras, este estudio incluyó 18 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión, sin embargo 7 de ellas completaron el protocolo de las cuales se describieron las características.

Análisis de datos

Se analizaron las variables cuantitativas, se representaron con medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar) e Intercuantil respectivamente. Con respecto a las variables cualitativas, se presentaron como frecuencias y proporciones.

Se evaluaron la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro Wilk; para comparar las diferentes variables de la reserva ovárica (FSH, AHM, CFA), así como el número de ovocitos y ovocitos maduros, pre y post aplicación de PaRP, se compraron con la prueba de T-student para muestras pareadas. Para las variables cuantitativas, se evaluará la normalidad de las variables continuas por medio de la prueba de normalidad Shapiro Wilk. Y se empleó la prueba de T-student o U de Mann-Whitney según corresponda.

Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism version 8.0.0 para Windows (San Diego, California, USA). Se considero un valor de $p < 0.05$ como significativo.

La Gestión de datos se realizó con cada paciente a quien se le asignó un identificador único para garantizar la confidencialidad de la información. Los datos fueron almacenados electrónicamente en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (2020), desde la cual se realizó el análisis estadístico correspondiente, permitiendo evaluar el impacto del PaRP en los parámetros hormonales de las participantes.

CAPITULO VIII

ASPECTOS ÉTICOS

El presente protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y Comité de investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, con numero de registro G123-00015

CAPITULO IX

RESULTADOS

Estandarización de la preparación del PaRP

Para seleccionar la técnica más eficiente en la preparación de PaRP, se evaluaron 3 protocolos diferentes, utilizando muestras obtenidas de voluntarias, cada protocolo fue analizado en términos de su eficacia en la recuperación de plaquetas, con el objetivo de identificar el de mayor calidad y recuperación del producto final, se evaluaron 3 protocolos los cuales se detallan en la **Tabla 3.**

Tabla 3.- Protocolos para la preparación de PaRP.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
1. Se obtuvieron ≈50 ml de sangre en tubos con solución ACD.	1. Se obtuvieron ≈20 ml de sangre en tubos con solución ACD.	1. Se obtuvieron ≈50 ml de sangre en tubos con solución ACD.
2. Centrifugación a 3800 rpm durante 10 min.	2. Centrifugación a 2000 rpm durante 5 min.	2. Centrifugación a 800 rpm durante 15 min.
3. Separación de plasma	3. Separación de plasma	3. Separación de plasma.
4. Centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos	4. Centrifugación a 3200 rpm durante 3 minutos.	4. Centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante hasta recuperar 7 ml de plasma.	5. Eliminar el sobrenadante hasta dejar el pellet y recuperar 7 mL.	5. Eliminar el sobrenadante hasta dejar el pellet y recuperar 7 mL.
6. Separar 1-2 ml para cuantificación de plaquetas.	6. Separar 1-2 ml para cuantificación de plaquetas.	6. Separar 1-2 ml para cuantificación de plaquetas.
7. Activación de PRP con gluconato de calcio (0.15:1)	7. Activación de PRP con gluconato de calcio (0.15:1).	7. Activación de PRP con gluconato de calcio (0.15:1).
8. Permitir la formación del coagulo.	8. Permitir la formación del coagulo.	8. Permitir la formación del coagulo.
9. Centrifugar a 3000 rpm durante 5-8 min.	9. Centrifugar a 3000 rpm durante 5-8 min.	9. Centrifugar a 3000 rpm durante 5-8 min.
10. Separar el plasma.	10. Separar el plasma.	10. Separar el plasma.

Como se observa en la **Tabla 4**, en las tres voluntarias, se presenta el porcentaje de recuperación plaquetaria correspondiente a cada evaluación. Se observó una eficiencia de recuperación superior al 100% al emplear la técnica 1 y 2 en los individuos 2 y 3, evidenciando una mayor eficiencia en la concentración plaquetaria obtenida.

Basándonos en estos hallazgos, se determinó que el Protocolo 2 ofrece las condiciones óptimas para la preparación de PRP. Esta decisión se fundamenta en su capacidad para garantizar un producto de alta calidad, asegurando así la reproducibilidad y efectividad, por lo cual este protocolo se empleó para el uso en las pacientes.

Tabla 4.- Comparación del porcentaje de recuperación según la técnica de preparación de PaRP.

	% RECUPERACIÓN		
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
INDIVIDUO 1	58		
INDIVIDUO 2	206	186	
INDIVIDUO 3	246	272	94

Efecto del PaRP

Se incluyeron un total de 18 participantes que cumplían criterios de inclusión, La edad media fue de 35.06 ± 3.2 años, el IMC fue de 26.5 ± 5.4 kg/m², la cuenta plaquetaria inicial fue de 274.2 ± 55.8 y post preparación de PRP 335.6 ± 167.4 con $p= 0.07$ con una recuperación superior del 100%, El valor promedio de FSH en las 18 pacientes fue de 20.90 ± 14.49 , la AMH 0.34 ± 0.36 , CFA pre 4.05 ± 2.20 y post 4 ± 2.8 , Ovocitos totales 3.94 ± 2.60 y MII 2.83 ± 2.59 como se documenta en la figura (**Figura 3**).

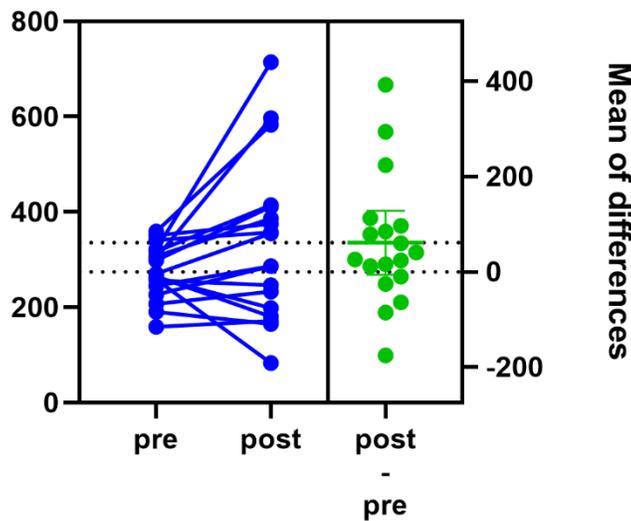


Figura 3. Recuperación plaquetaria pre y post (18 pacientes).

Evaluación de la respuesta ovárica post aplicación intraovarica de PaRP.

De las 18 pacientes que iniciaron el protocolo y recibieron la aplicación de PaRP durante su primer ciclo de estimulación ovárica controlada, 7 pacientes regresaron para realizar un segundo ciclo de estimulación, donde se sometieron nuevamente a las pruebas hormonales y conteo folicular antral, para completar así los datos pre y post aplicación de plasma, lo que represento un seguimiento completo en un 38.8% de los casos.

Al analizar las características clínicas de estas 7 pacientes, se observó que en ninguna de ellas se identificó un factor masculino como causa de infertilidad, lo que permitió enfocar la evaluación exclusivamente en factores relacionados con la función ovárica y los efectos del PaRP funcionando ellas mismas como control.

En estas 7 pacientes la edad promedio fue de 35.8 ± 3.5 años y el IMC promedio fue de 26.7 ± 6.0 kg/m², y los niveles de hemoglobina grafica fueron de 12.9 ± 1.1 (**Grafica 4**).

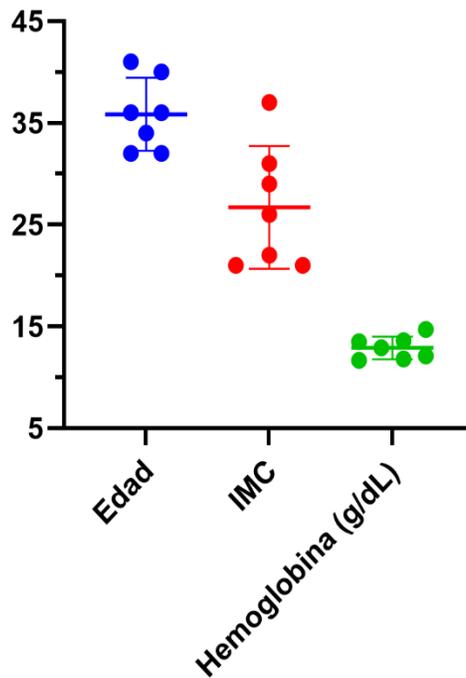


Figura 4. Características generales de las participantes

Las plaquetas mostraron una recuperación superior al 100%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de FSH, AMH, CFA o el conteo plaquetario total **Tabla 5.**

Tabla 5. Comparación de los niveles hormonales y CFA, pre y post aplicación de PaRP.

Variable	Pre	Post	p-value
Plaquetas	266.7 ± 42.3	355.6 ± 167.4	0.83
FSH	13.50 ± 7.35	14.25 ± 6.62	0.64
AMH	0.25 ± 0.22	0.36 ± 0.26	0.41
CFA	3.7 ± 1.7	4 ± 2.8	0.70

En cuanto al conteo de ovocitos totales pre-aplicación de PRP fue de 3.9 ± 2.6 con $p:0.6$, y el total de ovocitos inmaduros fue de 0.57 ± 0.78 con $p:0.1$, por lo que no se observa un aumento significativo del total de ovocitos totales o inmaduros.

Al comparar el número de ovocitos maduros se observó una tendencia o incremento en el número de ovocitos, sin embargo, no alcanzó significancia estadística, lo que podría indicar un potencial efecto positivo ($p = 0.06$) (**Figura 5**).

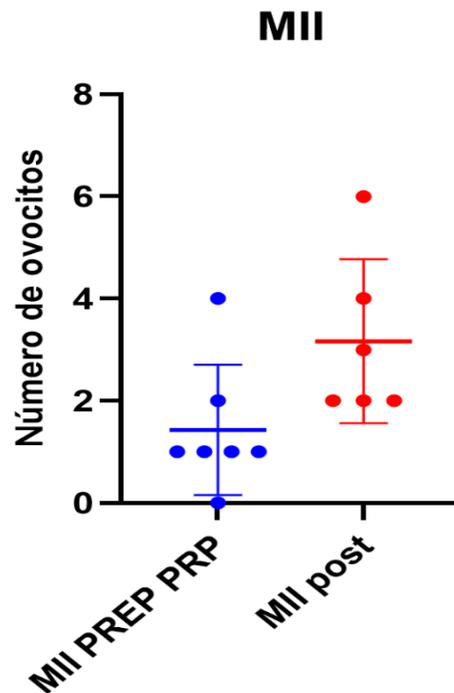


Figura 5. Numero de ovocitos maduros (MII) antes y después de aplicación de PaRP

Destacamos una paciente de 40 años, diagnosticada con infertilidad secundaria, 15 años de evolución, logró un embarazo espontáneo dos meses después de la aplicación del PaRP. Sin embargo, esta gestación presentó complicaciones y no logró evolucionar satisfactoriamente, culminando en un aborto a las 10 semanas de gestación. Este caso, identificado como "Caso 2", destaca un evento relevante en el contexto del protocolo, evidenciando una posible respuesta inicial al tratamiento, aunque sin un desenlace favorable, además se realizó transferencia de embriones en 2 pacientes, las β HCG se reportó negativa en ambas pacientes.

En cuanto a la seguridad del procedimiento, ninguna de las pacientes reportó complicaciones posteriores a la aplicación del PaRP. Específicamente, no se observaron casos de fiebre, dolor pélvico significativo ni otras reacciones adversas asociadas al procedimiento, lo que refuerza la seguridad del protocolo empleado.

CAPITULO XII

Discusión

En la presente investigación evalúa el efecto de la inyección intraovarica de PaRP en mujeres con baja reserva ovárica, nuestros hallazgos mostraron que los niveles hormonales de FSH, HAM y el CFA, no mejoro significativamente antes y después de la aplicación intraovarica de PaRP, sin embargo, es relevante enfatizar que el parámetro de ovocitos maduros mostró una tendencia cercana a la significancia estadística, lo que podría indicar un potencial efecto positivo del tratamiento en este indicador, se, resalta la necesidad de incrementar el número de pacientes para confirmar y ampliar estos hallazgos.

Además, se obtuvo un embarazo espontáneo luego de 2 meses de la aplicación del PaRP, en una paciente con larga historia de infertilidad secundaria (15 años). Sin embargo, la gestación no evolucionó satisfactoriamente y culminó en un aborto espontáneo, sin lograr el nacimiento de un recién nacido vivo, destacando un posible efecto inicial del tratamiento.

Estudios previos ya han buscado relacionar la inyección intraovarica de plasma rico en plaquetas y la mejoría en distintos parámetros hormonales relacionados con fertilidad^{15,25-28}. Sfakianoudis y colaboradores, informaron mejoría significativos en los niveles de HAM, CFA y la regularidad en los ciclos menstruales en pacientes con insuficiencia ovárica prematura, con una restauración de hasta el 60% de los ciclos menstruales y una tasa de nacidos vivos del 30%¹⁵, Cakiroglu y colaboradores demostraron que la inyección de PRP en mujeres con baja respuesta, aumento el conteo folicular antral, disminuyo los niveles de FSH y aumento la HAM, principales marcadores de reserva ovárica con una diferencia estadísticamente significativa($p < 0.01$), además el 8% de las pacientes logro un recién nacido vivo, ya fuese mediante FIV o de manera espontánea, y otro 8% logro congelar embriones²⁷. Pantos y colaboradores, describieron una series de casos de aplicación de plasma rico en plaquetas en 3 pacientes con insuficiencia ovárica prematura, donde se lograron restauración espontanea de los ciclos menstruales y embarazos con recién nacidos vivos en las 3 pacientes²⁹.

Sin embargo, la evidencia en otras revisiones no es concluyente, Farimani y colaboradores, demostraron que si bien el número total de ovocitos y el número total de MII aumentaron significativamente después de la aplicación de PRP, no obstante la FSH, la LH, el estradiol, no mostraron una mejoría significativa³⁰.

El mecanismo exacto de la acción del PRP en la promoción de la foliculogénesis y la función ovárica aún no se entiende bien, se enfatiza que el PRP podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de procesos fisiológicos de angiogénesis, crecimiento celular, apoptosis, control de la inflamación, proliferación celular y migración celular³¹, los gránulos de las plaquetas contienen grandes concentraciones de factores de crecimiento importantes como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2)³², los últimos estudios demuestran que la lesión mecánica, junto a la aplicación del PRP, podría activar la polimerización de actina, proceso que lleva a la interrupción de la vía de la proteína quinasa Hippo (Hpo), la cual tiene un papel crucial en la activación y desarrollo folicular, la vía Hpo aún se encuentra en investigación y sería valioso esclarecerla como parte del mecanismo de acción del PRP, sin embargo se sabe que el efecto que ejercen los factores de crecimiento derivados de plaquetas pueden mejorar el microambiente ovárico, aumentar la activación y estabilización vascular e incluso podría resultar en el desarrollo de ovocitos de Novo a partir de células madre precursoras³³.

La mayoría de los estudios de pacientes que fueron sometidas a PRP intraovarico, no han evaluado la tasa de implantación, la tasa de embarazo clínico, la tasa de aborto espontáneo y la tasa de nacidos vivos, sin embargo Farimani y colaboradores valoraron la tasa de embarazo en mujeres con pobre respuesta ovárica de acuerdo a los criterios de POSEIDON y han informado una tasa de embarazo de 14.6% entre estas mujeres³⁰, En el presente estudio, se documentó un caso de embarazo clínico en una paciente de 40 años diagnosticada con infertilidad secundaria con más de 15 años de evolución. Este evento ocurrió tras la aplicación de PaRP como parte del protocolo experimental. La paciente no había logrado concebir previamente mediante otros métodos, lo que resalta la importancia de este resultado, Aunque se trata de un único caso dentro del estudio, este hallazgo sugiere un posible efecto beneficioso del PaRP en la función reproductiva.

Actualmente no existe un acuerdo sobre el número estándar de inyecciones intraováricas, la localización (cortical o subcortical) o la frecuencia de la aplicación del PRP, se eligió el tratamiento de 3 meses, basándose en el principio fisiológico de que el desarrollo folicular lleva de 90 a 120 días desde el momento del reclutamiento del folículo primordial hasta las etapas finales del desarrollo antral^{6,7,21,22,33}, existen diferentes métodos de preparación y concentraciones de PRP, que puede dar como resultado diferentes productos y a su vez pueden tener diferentes efectos, en este estudio se desarrolló y protocolizó la preparación del PaRP, con el objetivo de garantizar la calidad y homogeneidad en la aplicación de los concentrados plaquetarios a nivel intraovárico, se recolectó la sangre periférica, se centrifugó 2 veces, después de la primera centrifugación, la capa leucocitaria y de plaquetas fue transferida a otro tubo, para así realizar la segunda centrifugación, se realizó activación plaquetaria con gluconato de calcio (10% en 100ml), agregando 0.15ml por cada ml de plasma, y posteriormente la aplicación de 2.5cm³, en cada ovario de acuerdo al protocolo descrito previamente, la concentración de plasma activo inyectado era mayor del 100% superior a la concentración basal del suero en promedio, este enfoque estandarizado, permite garantizar la consistencia en la calidad del producto obtenido, optimizando su efectividad y seguridad, al eliminar variaciones del procedimiento, se facilita la comparación de resultados entre estudios y se refuerza la validez científica de los hallazgos.

Dentro de las fortalezas de este estudio encontramos la capacidad para generar evidencia preliminar sobre la seguridad, factibilidad del uso de esta terapia en el contexto clínico de la infertilidad. Este diseño piloto, permite identificar tendencias iniciales en los efectos del PaRP, Y evaluar la viabilidad del protocolo antes de implementarlo en estudios a gran escala.

Otra fortaleza importante es que la implicación de la aplicación del plasma autólogo minimiza los riesgos de reacciones inmunológicas adversas, reforzando así el perfil de seguridad del tratamiento.

Es importante destacar que la aplicación y preparación de todos los PaRP en este protocolo fue realizada por los mismos operadores. Garantizando la estandarización del procedimiento, evitando variaciones en las técnicas de aplicación y desarrollo del PaRP. Este enfoque minimiza sesgos relacionados con los operadores y fortalece la reproducibilidad del protocolo en futuros estudios.

Estos hallazgos son particularmente valiosos en el contexto de nuestro centro, ya que permite la individualización de la aplicación de terapias emergentes claves, en los diferentes contextos de infertilidad, brindando así oportunidades para todas las pacientes de acuerdo con su contexto clínico.

Una limitación importante del estudio es el bajo número de pacientes que completaron el protocolo, lo que restringe la generalización de los hallazgos. Además, el seguimiento limitado a dos ciclos no permite evaluar los efectos a largo plazo del PaRP.

No hay informes de ningún efecto adverso grave asociado a la inyección de PaRP en los ovarios, además no se observaron efectos secundarios en los ovarios, sin embargo, se reconoce que el efecto a largo plazo de la administración de factores de crecimiento en un tejido conlleva a un riesgo teórico de inducir una transformación maligna.

CAPITULO XIII

Conclusión

En este estudio piloto, la inyección intraovárica de plasma autólogo rico en plaquetas en mujeres con baja reserva ovárica no mostró una mejoría estadísticamente significativa en parámetros de función ovárica, como niveles de FSH, AMH y CFA. Sin embargo, se observó una tendencia al momento, en los ovocitos MII, lo que sugiere un posible efecto positivo del tratamiento. Sobresale el caso de un embarazo espontáneo en una paciente con infertilidad de larga evolución tras la aplicación de PaRP. Estos hallazgos preliminares sugieren que el PaRP podría tener un potencial terapéutico, abriendo nuevas oportunidades para optimizar estrategias de estimulación ovárica en pacientes con baja reserva, aunque se requiere investigación adicional dado el reducido número de pacientes incluidas.

Conflictos de interés:

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

CAPITULO XIV

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sauer M V. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril*. 2015;103(5):1136-1143. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.03.004
2. Keikha F, Shahsavari S, Salari Y, et al. One Side Ovarian Rejuvenation: A Quasi-Experimental Study of the Effect of the Autologous Platelet Rich Plasma in Poor Ovarian Responders in IVF. *Ethiop J Health Sci*. 2022;32(6):1133-1140. doi:10.4314/ejhs.v32i6.10
3. Attali E, Yogev Y. The impact of advanced maternal age on pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021;70(2021):2-9. doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.06.006
4. Rodríguez Flores J, Palomar Gallego MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: Fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2012;34(1):8-17. doi:10.1016/j.maxilo.2011.10.007
5. Atkinson L, Martin F, Sturmey RG. Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: Too much too soon? *Hum Reprod*. 2021;36(7):1737-1750. doi:10.1093/humrep/deab106
6. Aflatoonian A, Lotfi M, Saeed L, Tabibnejad N. Effects of Intraovarian Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma on Ovarian Rejuvenation in Poor Responders and Women with Primary Ovarian Insufficiency. *Reprod Sci*. 2021;28(7):2050-2059. doi:10.1007/s43032-021-00483-9
7. Farquhar C, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: An overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(8). doi:10.1002/14651858.CD010537.pub5
8. Datta AK, Maheshwari A, Felix N, Campbell S, Nargund G. Mild versus conventional ovarian stimulation for IVF in poor, normal and hyper-responders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2021;27(2):229-253. doi:10.1093/humupd/dmaa035
9. Lebovitz O, Haas J, Mor N, et al. Predicting IVF outcome in poor ovarian responders. *BMC Womens Health*. 2022;22(1):1-8. doi:10.1186/s12905-022-01964-y

10. Abu-Musa A, Haahr T, Humaidan P. Novel physiology and definition of poor ovarian response; clinical recommendations. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1-20. doi:10.3390/ijms21062110
11. Polyzos NP, Nwoye M, Corona R, et al. Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(4):469-474. doi:10.1016/j.rbmo.2013.11.010
12. Busnelli A, Papaleo E, Del Prato D, et al. A retrospective evaluation of prognosis and cost-effectiveness of IVF in poor responders according to the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2015;30(2):315-322. doi:10.1093/humrep/deu319
13. Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase II, 1981. *Fertil Steril.* 1983;39(2):174-179. doi:10.1016/S0015-0282(16)46815-9
14. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1616-1624. doi:10.1093/humrep/der092
15. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Grigoriadis S, et al. Reactivating ovarian function through autologous platelet-rich plasma intraovarian infusion: Pilot data on premature ovarian insufficiency, perimenopausal, menopausal, and poor responder women. *J Clin Med.* 2020;9(6):1-25. doi:10.3390/jcm9061809
16. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-496. doi:10.1016/j.joms.2003.12.003
17. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica. *Av en Periodoncia e Implantol Oral.* 2007;19(1):39-52. doi:10.4321/s1699-65852007000200005
18. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: A literature review. *Implant Dent.* 2009;18(4):303-310. doi:10.1097/ID.0b013e31819e8ec6
19. Collins T, Alexander D, Barkatali B. Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev.* 2021;64(4):225-235. doi:10.1302/2058-5241.6.200017
20. Saucedo JM, Yaffe MA, Berschback JC, Hsu WK, Kalainov DM. Platelet-rich plasma. *J Hand Surg Am.* 2012;37(3):587-589. doi:10.1016/j.jhsa.2011.12.026
21. Hosseinisadat R, Farsi Nejad A, Mohammadi F. Intra-ovarian infusion of autologous platelet-rich plasma in women with poor ovarian reserve: A before and after study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2023;280(November 2022):60-63. doi:10.1016/j.ejogrb.2022.11.001

22. Barad DH, Albertini DF, Molinari E, Gleicher N. Preliminary report of intraovarian injections of autologous platelet-rich plasma (PRP) in extremely poor prognosis patients with only oocyte donation as alternative: a prospective cohort study. *Hum Reprod Open*. 2022;2022(3):1-9. doi:10.1093/hropen/hoac027
23. González M, Arteaga-Vizcaíno M, Benito M, Benito M. Aplicación del plasma rico en plaquetas (PRP) y sus derivados en implantología dental y cirugía plástica. *Investig Clin*. 2012;53(4):408-418.
24. Tandulwadkar S, Selva Karthick M. Combined use of autologous bone marrow-derived stem cells and platelet-rich plasma for ovarian rejuvenation in poor responders. *J Hum Reprod Sci*. 2020;13(3):184-190. doi:10.4103/jhrs.JHRS_130_19
25. Farimani M, Heshmati S, Poorolajal J, Bahmanzadeh M. A report on three live births in women with poor ovarian response following intra-ovarian injection of platelet-rich plasma (PRP). *Mol Biol Rep*. 2019;46(2):1611-1616. doi:10.1007/s11033-019-04609-w
26. Pacu I, Zygouropoulos N, Dimitriu M, Rosu G, Ionescu C. Use of platelet-rich plasma in the treatment of infertility in poor responders in assisted human reproduction procedures. *Exp Ther Med*. 2021;22(6):1-6. doi:10.3892/etm.2021.10848
27. Cakiroglu Y, Yuceturk A, Karaosmanoglu O, et al. Aging-14-203972. 2022;14(6):2513-2523.
28. Navali N, Sadeghi L, Farzadi L, et al. Intraovarian Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Improves Therapeutic Approaches in The Patients with Poor Ovarian Response: A Before-After Study. *Int J Fertil Steril*. 2022;16(2):90-94. doi:10.22074/IJFS.2021.533576.1154
29. Pantos K, Simopoulou M, Pantou A, et al. A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment. *Cell Transplant*. 2019;28(9-10):1333-1340. doi:10.1177/0963689719859539
30. Farimani M, Nazari A, Mohammadi S, Anvari Aliabad R. Evaluation of intra-ovarian platelet-rich plasma administration on oocytes-dependent variables in patients with poor ovarian response: A retrospective study according to the POSEIDON criteria. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19(1):1-6. doi:10.1186/s12958-021-00826-w
31. Park H bum, Yang J hee, Chung K hoe. Kjh-46-265.Pdf. *KOREAN J Hematol*. 2011;2.
32. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circ Res*. 2018;122(2):337-351. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310795

33. Vahabi Dastjerdi M, Sheibani S, Taheri M, et al. Efficacy of intra-ovarian injection of autologous platelet-rich plasma in women with poor responders: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2024;309(6):2323-2338. doi:10.1007/s00404-024-07442-0