



Doble estimulación ovárica con gonadotropinas (DuoStim): indicaciones y resultados en ciclos de FIV/ICSI

Ovarian double stimulation with gonadotropins (DuoStim): indications and results in cycles of FIV/ICSI.

Miriam Yusely Sánchez-Tafoya, Lorena Ruvalcaba-Ortega, Daniel Zepeda-Escamilla, Claudia González-Ortega, Antonio Martín Gutiérrez-Gutiérrez

Resumen

OBJETIVO: Comparar los desenlaces clínicos y de laboratorio de ciclos de FIV-ICSI en pacientes atendidas en el Instituto Vida León, en quienes se aplicó un protocolo de doble estimulación (DuoStim).

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio prospectivo y descriptivo efectuado en pacientes con baja respuesta ovárica, con indicación de estudio genético preimplantacional para aneuploidías y necesidad de preservación de la fertilidad. Los datos continuos se presentan como media absoluta con desviación estándar. La evaluación de las diferencias entre variables continuas se hizo con la prueba t pareada.

RESULTADOS: Se estudiaron 65 pacientes que se dividieron en tres grupos: Grupo 1 (n = 33): doble estimulación. Grupo 2 (n = 14): con indicación de estudio genético preimplantacional para aneuploidías y doble estimulación. Grupo 3 (n = 4) pacientes para preservación de la fertilidad. De las pacientes del Grupo 1 se obtuvieron 96 embriones, de ellos 69 de buena calidad (71%). La tasa de implantación fue de 29% y la tasa de embarazo de 60% y de embarazo clínico de 45%. De las pacientes del Grupo 2 se obtuvieron 49 embriones, 39 de buena calidad. A las pacientes del Grupo 3 se les realizó DuoStim por deseo de preservación de la fertilidad.

CONCLUSIONES: Las pacientes con baja respuesta ovárica se beneficiaron con la doble estimulación indicada para estudio genético preimplantacional para aneuploidías o preservación de la fertilidad: se consiguió mayor cantidad de óvulos en un mismo ciclo menstrual en menor tiempo.

PALABRAS CLAVE: ICSI; aneuploidía; preservación de la fertilidad; implantación; tasa de embarazo.

Abstract

OBJECTIVE: To compare the clinical and laboratory outcomes of IVF-ICSI cycles in patients treated at Instituto Vida León, in whom a double stimulation protocol (DuoStim) was applied.

MATERIAL AND METHOD: Prospective and descriptive study carried out in patients with low ovarian response, with indication of preimplantation genetic study for aneuploidies and need of fertility preservation. Continuous data are presented as absolute mean with standard deviation. The evaluation of the differences between continuous variables was done with the paired t-test.

RESULTS: Sixty-five patients were studied and divided into three groups; Group 1 (n = 33): double stimulation. Group 2 (n = 14): with indication of preimplantation genetic study for aneuploidy and double stimulation. Group 3 (n = 4): patients for preservation of fertility. Of the patients in Group 1, 96 embryos were obtained, of which 69 were of good quality (71%). The implantation rate was 29% and the pregnancy rate was 60% and the clinical pregnancy rate was 45%. Forty-nine embryos were obtained from Group 2 patients, 39 of which were of good quality. Group 3 patients underwent DuoStim for fertility preservation.

Instituto de Ciencias en Reproducción
Humana Vida, León, Guanajuato,
México.

Recibido: 1 de julio 2019

Aceptado: 9 de junio 2020

Correspondencia

Miriam Yusely Sánchez Tafoya
Yusy_08@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Sánchez-Tafoya MY, Ruvalcaba-Ortega L, Zepeda-Escamilla D, González-Ortega C, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Doble estimulación ovárica con gonadotropinas (DuoStim) indicaciones y resultados en ciclos de FIV/ICSI. Reproducción (México). 2020; Vol. 11: 24 de agosto 1-8. <https://doi.org/10.24245/rmmr.v11id.3851>



Piperidolato

Acción dual inmediata!

Menos contracciones. Menos dolor

Indicado como **COADYUVANTE** en
el tratamiento **de:**



**PARTO
PRETÉRMINO**



¡YA DISPONIBLE!

En farmacias

Referencias: 1. Rothlin R. P. Farmacología I Colinérgicos y anticolinérgicos. 2003. Pág 1-33. Disponible en: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/03/apunte-farmacologiadesistemacolinergico.pdf>.
2. Información para prescribir Dactil® OB.

Material exclusivo para el Profesional de la Salud.

4M: MAT-MX-2001670

CONCLUSIONS: Patients with low ovarian response benefited from the double stimulation indicated for preimplantation genetic study for aneuploidies or fertility preservation: more eggs were obtained in the same menstrual cycle in less time.

KEYWORDS: ICSI; Aneuploidy; Fertility preservation; Preservation of fertility; Implantation; Pregnancy rate.

ANTECEDENTES

El desarrollo folicular es un proceso sumamente dinámico, con teorías que con el tiempo se han ido modificando. La primera de ellas hace referencia a la teoría del episodio de reclutamiento único, donde hay una sola cohorte de folículos antrales que crecen durante la fase folicular del ciclo ovárico, después de la fase lútea.¹ Otra de las teorías se refiere al reclutamiento continuo, en la que los folículos empiezan a crecer y tienden a la regresión continuamente durante el ciclo ovárico.² La teoría de las olas, que plantea el reclutamiento de dos a tres cohortes de folículos antrales por ciclo ovárico.³ Los estudios recientes sugieren que en mujeres con ciclos menstruales más largos se observa una tercera ola de crecimiento folicular. Esto puede demostrarse en una exploración ultrasonográfica vaginal.⁴

En la actualidad se dispone de diversos protocolos que pueden aplicarse en los tratamientos de reproducción asistida. Todos deben adaptarse a las necesidades de cada pareja y con el mismo objetivo: reunir la mayor cantidad de óvulos para tener mejores posibilidades de embarazo.⁵ En este escenario se ha propuesto una nueva estrategia: la doble estimulación en el mismo ciclo ovárico (DuoStim). La primera experiencia con la doble estimulación la reportaron Kuang y su grupo (protocolo Shangai), quienes mostraron que la calidad de los embriones obtenidos en fase folicular y lútea era similar, con desenlaces equiparables.⁶

Las pacientes con baja reserva ovárica son un grupo que ha sido favorecido con esta estrategia de estimulación, con la finalidad de obtener más ovocitos en menos tiempo. La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Esterilidad (ESHRE) propone que la baja respuesta ovárica, para considerarse como tal, debe cumplir dos de las siguientes tres características: 1) edad materna avanzada u otro factor de riesgo, 2) cirugía ovárica previa y 3) baja respuesta ovárica previa o una prueba de reserva ovárica anormal.⁷ Recientemente se dio a conocer la clasificación POSEIDON (*Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number*) con mejor categorización del espectro de pacientes con baja respuesta. Las clasifica según la reserva ovárica y la edad. Este grupo resalta la importancia de individualizar la estimulación con base en las posibilidades de cada paciente de obtener blastos euploidies, que es el objetivo principal de la estimulación ovárica.⁸ En esta clasificación las pacientes del grupo 3 (menores de 35 años con predictores de baja reserva) y del grupo 4 (mayores de 35 años con predictores de baja reserva) se benefician con la doble estimulación.

Otro grupo de pacientes idóneas para este protocolo son a quienes se efectúa el estudio genético para aneuploidías (PGTa) previo a la implantación, que es una estrategia que aumenta la posibilidad de un blasto euploide de 40 a 70%.⁹

Además de las indicaciones descritas, la preservación de la fertilidad social o por un diagnóstico oncológico pueden ser indicación de la doble



estimulación.⁹ Existen pacientes oncológicas con necesidad urgente de iniciar tratamiento médico o quirúrgico. Al no contar con tiempo para estimulaciones convencionales puede recurrirse a la doble estimulación para optimizar la mayor obtención de óvulos en menor tiempo.¹⁰

A la fecha no se encontraron publicaciones de aplicación de este protocolo en México. En el estudio se reportan los desenlaces clínicos y de laboratorio de los diferentes grupos de pacientes en quienes se aplicó este protocolo de estimulación. El objetivo de este estudio fue: comparar los desenlaces clínicos y de laboratorio de ciclos de FIV-ICSI en pacientes atendidas en el Instituto Vida León, en quienes se aplicó un protocolo de doble estimulación (DuoStim).

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo y descriptivo efectuado en pacientes del Instituto de Ciencias en Reproducción Humana VIDA León, Guanajuato, atendidas entre febrero de 2018 y mayo de 2019, por diagnóstico de baja respuesta ovárica, con indicación de estudio genético preimplantacional para aneuploidías y necesidad de preservación de la fertilidad. Se incluyeron todas las pacientes a quienes se aplicó el protocolo DuoStim con el propósito de obtener más óvulos y comparar la calidad de éstos en fase folicular y lútea de estimulación. Todas las pacientes completaron el estudio de infertilidad, que incluyó pruebas hormonales: perfil ovárico basal, perfil tiroideo y hormona antimülleriana; ultrasonido pélvico con recuento de folículos antrales en el día 2 del ciclo, espermatobioscopia y estudio de fragmentación del ADN espermático y estudios de imagen (histerosalpingografía en algunas pacientes que lo requirieron).

Luego de decidir el inicio de ciclo de hiperestimulación ovárica para FIV-ICSI o vitrificación de óvulos, se determinó quiénes tenían indicación para DuoStim: las de baja reserva ovárica, corres-

pondientes a los grupos 3 y 4 de la clasificación de POSEIDON (grupo 1), pacientes con aparente buena reserva que requerían mayor cantidad de ovocitos por reunir los requisitos para el programa de PGTA por edad avanzada o grupo 2 de la clasificación de POSEIDON, o pacientes idóneas para la preservación de la fertilidad por motivos oncológicos que requerían acortar el tiempo para poder iniciar el tratamiento médico o quirúrgico (grupo 3).

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para el procedimiento de FIV-ICSI. Además, las pacientes a las que se realizó prueba genética previa a la implantación firmaron un consentimiento específico para ese estudio.

Estimulación ovárica

Todas las pacientes recibieron 4 mg de estradiol en fase lútea del ciclo previo a la estimulación. La primera etapa de la estimulación ovárica se inició entre los días 1 y 5 del ciclo, corroborando el reposo ovárico. Se administraron 300 UI de gonadotropinas recombinantes y 150 UI de LH (Pergoveris, Merck); en algunas de ellas una dosis adicional de FSH recombinante de 75 UI (Gonal F, Merck). Se siguió un protocolo de dosis flexible con antagonista y seguimiento folicular descrito previamente en nuestro instituto.¹¹

La punción transvaginal, guiada con ultrasonido para captura ovular, se hizo 36 a 38 horas después de la administración de hGCr (Ovidrelle, Merck). Al quinto día posterior a la primera captura se reinició la estimulación ovárica con la misma dosis y el protocolo descrito, de igual manera el disparo de ovulación se realizó con hGCr (Ovidrelle, Merck).

Inseminación y cultivo embrionario

La preparación del semen, identificación y cultivo de ovocitos y embriones se efectuó mediante

protocolos preestablecidos para fertilización *in vitro* e ICSI.¹² Después de la captura de ovocitos se lavaron en HTF con Hepes (LifeGlobal), se cultivaron en microgotas con 20 µL de Global for Fertilization (LifeGlobal) complementado al 5% HSA (LifeGlobal) y se cubrieron con parafina líquida; posteriormente se microinyectaron conforme a la técnica previamente publicada.¹³ Los ovocitos inyectados se evaluaron después de 17-20 h para observar la formación de pronúcleos y confirmar la adecuada fertilización. Los cigotos resultantes se cultivaron en microgotas, con 20 µL de Global (LifeGlobal) complementado con HSA (LifeGlobal) a 5%, en ambiente de 6% de CO₂ y 5 % de O₂.

Se evaluó la morfología embrionaria, establecida por la cantidad y regularidad de los blastómeros, grado de fragmentación y existencia de mono o multinucleación. Los embriones se clasificaron en: excelentes cuando en día 2 tuvieron menos de 10% de fragmentación y 4 blastómeros simétricos, y en día 3 menos de 10% de fragmentos y 8 blastómeros simétricos, sin multinucleación. El cultivo a blastocistos se evaluó con la clasificación de Gardner y Schoolcraft. Los blastocistos se evaluaron según su grado de expansión, calidad de la masa celular interna y trofoectodermo. Los blastocistos en grado 3-4 de expansión, con masa celular interna y trofoectodermo grado A o B en el día 5 se consideraron de excelente calidad.

Los embriones se criopreservaron en el día 3 o 5 según la indicación de establecer o no diagnóstico genético previo a la implantación.

Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria se efectuó en ciclos naturales o mediante administración de estrógenos antes del bloqueo pituitario, individualizada en cada paciente. Para transferencia se seleccionaron los embriones con mejor clasificación de calidad conforme a la cantidad y regularidad de

las blastómeros, de fragmentos extracelulares y existencia de mono o multinucleación. La técnica se llevó a cabo con guía ultrasonográfica, con un catéter de Frydman ultrasoft o Wallace. Las pacientes permanecieron en reposo durante una hora después de la transferencia embrionaria. En todos los casos se utilizó soporte lúteo con progesterona, individualizado conforme a la preparación endometrial.

La prueba de fracción beta hGC se llevó a cabo a los 14 días posteriores a la transferencia embrionaria. El embarazo clínico se definió según la existencia de latido cardíaco fetal por ultrasonido a las 6 a 7 semanas.

Para los embriones con estudio genético previo a la implantación en el día 4 de desarrollo embrionario, se llevó a cabo la perforación de la zona pelúcida con láser, para facilitar la herniación de las células del trofoectodermo. La biopsia se tomó en el día 5 o 6, dependiendo del estado de expansión del blastocisto y su calidad. Con ayuda del láser se tomaron de 5 a 10 células del trofoectodermo, depositadas en tubos para PCR. En todos los casos los blastocistos biopsiados se vitrificaron en Cryotop® (Kitazato) y los embriones permanecieron congelados en espera del reporte del análisis genético de aneuploidías.¹⁴

Análisis genético preimplantacional para aneuploidías

Las biopsias embrionarias se almacenaron a -20° hasta el día de su análisis. Se analizaron todos los embriones, en todos los casos se efectuó el análisis genético de aneuploidías mediante *next generation sequencing* (NGS) con el protocolo de Ion ReproSeq TM PGS Kits (ThermoFisher Scientific) en el secuenciador Ion Torrent PGM, conforme a las especificaciones del fabricante (Ion Torrent, Estados Unidos). Los reportes se analizaron con el programa Ion Reporter (versión 5.10.5) mediante el Workflow reproSeq



PGS w1.1. Los embriones se diagnosticaron normales cuando no se encontraron alteraciones cromosómicas detectables; anormales en los que se encontraron desequilibrios cromosómicos y como falla en la amplificación en los que no se obtuvo ADN a partir de la biopsia embrionaria.

En el grupo de pacientes con procedimientos para preservación de la fertilidad se aplicó el protocolo de estimulación ovárica descrito. Cuando los ovocitos se obtuvieron el día de la aspiración folicular se congelaron siguiendo las normas de criopreservación establecidas para vitrificación con el método de Kitazato.¹⁵

Los datos continuos se reportan con media absoluta y desviación estándar. La prueba t pareada se usó para evaluar diferencias entre variables continuas. Se consideran significativos los valores de $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 19.

RESULTADOS

Se estudiaron 65 pacientes; 47 del grupo 1 de baja respuesta ovárica, 14 con indicación de análisis genético de aneuploidías y un grupo minoritario de 4 pacientes con protocolo para preservación de la fertilidad (**Cuadro 1**).

La edad promedio de las pacientes del grupo 1 fue de 38.66 ± 3.0 años, las concentraciones medias de FSH, LH y hormona antimülleriana fueron: 10.3 ± 0.4 , 8.0 ± 3.4 y 0.9 ± 0.5 , respectivamente. No existieron diferencias significativas en los días de estimulación ovárica, dosis de gonadotropinas administradas, total de óvulos capturados, cantidad de óvulos en metafase II y cantidad de óvulos fertilizados entre la fase folicular y lútea. En la fase folicular se obtuvieron 101 embriones: 60 de buena calidad (59%). En la fase lútea se obtuvieron 96 embriones: 69 fueron de buena calidad (71%). La tasa de implantación fue de 29%, con tasa de embarazo de 60% y de

embarazo clínico de 45%. En el grupo de baja reserva ovárica lograron el embarazo 20 de 33 pacientes transferidas. Se utilizaron embriones de fase folicular y lútea.

En el grupo 2 ($n = 14$), correspondiente a doble estimulación por indicación de análisis genético de aneuploidías, la edad promedio fue de 38.42 ± 4.30 años. Las concentraciones medias de FSH, LH y hormona antimülleriana fueron: 8.66 ± 2.77 , 6.90 ± 2.7 y 2.33 ± 1.12 , respectivamente. Los días de estimulación, dosis de FSH, cantidad de óvulos totales y maduros y la tasa de fertilización fueron similares. Del total de embriones obtenidos para el grupo de pacientes con indicación de análisis genético de aneuploidías en la fase folicular se obtuvieron 49 embriones de los que 39 eran de buena calidad (79%), *versus* la cantidad de embriones obtenidos en la fase lútea: 41, de ellos 39 de buena calidad (95%; **Cuadro 2**). En el grupo de análisis genético de aneuploidías lograron el embarazo 7 de 10 transferencias efectuadas (tasa de gestación 70%), 4 permanecen en espera de transferencia. La tasa de implantación fue, igualmente, de 70% porque solo se hizo la transferencia de embrión único en todos los casos.

En el grupo 3 ($n = 4$) de doble estimulación por deseo de preservación de la fertilidad la edad promedio fue de 34.5 ± 5.8 años, con concentraciones medias de FSH, LH y hormona antimülleriana de 11.2 ± 1.3 , 9.3 ± 1.84 y 2 ± 1.3 , respectivamente. En cuanto a los días de estimulación ovárica controlada, la dosis de gonadotropinas de FSH y LH, la obtención de óvulos y la cantidad de embriones en metafase II no hubo diferencia estadística significativa. A pesar de obtener mayor cantidad de óvulos en la fase lútea (3.5 ± 1.2) que en la folicular (2.5 ± 1.2), la diferencia no fue significativa. En este grupo de pacientes no se efectuó la fertilización de los óvulos obtenidos debido a que la indicación fue preservación de la fertilidad (**Cuadro 3**).

Cuadro 1. Grupo de pacientes con baja reserva ovárica (n = 47)

Variables	Fase folicular	Fase lútea	Valor de p
Días estimulación	10.6 ± 2.3	11.1 ± 2.6	ns
Dosis FSH	3456.3 ± 1074.8	3627.6 ± 1095.7	ns
Dosis LH	1606.3 ± 401.9	1702.65 ± 496.9	ns
Ovocitos totales	4.40 ± 2.4	4.38 ± 2.96	ns
Ovocitos MII	3.10 ± 1.98	3.34 ± 2.76	ns
Ovocitos fertilizados	3 ± 2.06	3.41 ± 2.32	ns
Embriones calidad	3.2 ± 1.21	3.1 ± 2.1	ns
Embriones transferidos	1.51 ± 2.1	1.33 ± 1.2	ns

Tasa de gestación: 60%. ns: no significativo.

Cuadro 2. Grupo de pacientes con indicación de análisis genético de aneuploidías (n = 14)

Variables	Fase folicular	Fase lútea	Valor de p
Días estimulación	9.92 ± 0.99	10.85 ± 1.46	ns
Dosis FSH	2871.42 ± 495.25	3364.28 ± 1186.9	ns
Dosis LH	1478.57 ± 164.91	1730.35 ± 420.64	ns
Ovocitos totales	8.42 ± 3.29	8.92 ± 3.62	ns
Ovocitos MII	6.14 ± 1.81	6.35 ± 3.02	ns
Ovocitos fertilizados	6 ± 2.32	6 ± 3.2	ns
Embriones calidad	2.9 ± 1.41	3.1 ± 2.1	ns
Embriones transferidos	1.1 ± 1.5	1.2 ± 1.3	ns

Tasa de gestación: 70%. ns: no significativo.

Cuadro 3. Pacientes para preservación de la fertilidad (n = 4)

Variables	Fase folicular	Fase lútea	Valor de p
Días estimulación	13 ± 3.5	12.5 ± 3.0	ns
Dosis FSH	4500 ± 1868.6	4012.5 ± 1360.7	ns
Dosis LH	1950 ± 536.6	1725.35 ± 525	ns
Ovocitos totales	2.5 ± 1.2	3.5 ± 1.2	ns
Ovocitos MII	1.5 ± 0.5	2.5 ± 0.8	ns

ns: no significativo.

DISCUSIÓN

El tiempo es un factor importante para todas los pacientes, pero decisivo para quienes tie-

nen diagnóstico de infertilidad, enfermedades oncológicas o desean preservar la fertilidad por motivos oncológicos, pacientes con mal pronóstico reproductivo y para las parejas que



desean estudio genético previo a la implantación.

Con los tratamientos de estimulación utilizados actualmente es posible la obtención de más ovocitos; esto significa mejor oportunidad de tener blastocistos de buena calidad para la transferencia. Cuanto mayor es el número de blastocistos, mayor es la posibilidad de encontrar embriones euploides, totalmente competentes para dar origen a un embarazo.¹⁶

En consecuencia, la doble estimulación (DuoStim) tiene como propósito aumentar significativamente la cantidad de ovocitos recuperados durante un lapso específico, un solo ciclo menstrual. Los desenlaces del estudio aquí reportado demuestran que la doble estimulación (DuoStim) es una excelente herramienta que puede implementarse para obtener mayor cantidad de óvulos y embriones; además de poder aplicarla en pacientes con indicación de estudio genético previo a la implantación, y en las que tienen deseos de preservación de la fertilidad por condición social u oncológica. En los tres grupos de estudio se encontraron valores muy semejantes en la obtención de óvulos, metafase II, y fertilización. Por esto se considera que la doble estimulación tiene excelente indicación cuando la finalidad es obtener la mayor cantidad de óvulos en el menor tiempo posible.

Los desenlaces del estudio son semejantes a los obtenidos por Ubaldi y su grupo,⁵ quienes consiguieron una cantidad similar de ovocitos en fase folicular y lútea en pacientes con baja respuesta, desenlaces equiparables al grupo 1 de estudio de pacientes con baja respuesta. De la misma manera, los desenlaces obtenidos con el protocolo Shangai de Kuang⁶ muestran similar cantidad de óvulos y madurez.

El grupo 2 de estudio de pacientes con respuesta normal es interesante porque no eran de baja reserva, pero sus condiciones clínicas requerían mayor cantidad de óvulos debido a que habían ingresado a protocolos de análisis genético de aneuploidías por tener edad avanzada. Esta indicación la describieron previamente Ubaldi y su grupo,¹⁵ quienes encontraron similitud en cantidad y calidad de ovocitos en ambas fases de estimulación, desenlaces que concuerdan con los de este estudio.

La preservación urgente de la fertilidad es una realidad en nuestro medio. Las pacientes acuden a preservar ovocitos faltando muy poco para el inicio del tratamiento oncológico médico o quirúrgico, lo que obliga a aplicar estrategias rápidas y lo más eficaces posible. Puede recurrirse a la maduración *in vitro* de óvulos, el inicio de estimulación en la fase lútea, o en cualquier etapa del ciclo (*random start*)¹⁰ o recurrir a la doble estimulación cuando al menos se dispone de un mes para poder llevar a cabo la preservación de la fertilidad y la cantidad de ovocitos obtenidos en la primera fase del ciclo no sea suficiente, como en las 4 pacientes que, además de requerir preservación de la fertilidad, todas tenían baja reserva ovárica y, si bien pudo obtenerse una media de 2.5 ovocitos en fase folicular, en la fase lútea se obtuvo una media de 3.5 ovocitos, con lo que se incrementaron sus posibilidades futuras de embarazo.

CONCLUSIÓN

Este estudio demuestra que la doble estimulación (DuoStim), indicada a pacientes con baja respuesta ovárica o con otras indicaciones (análisis genético de aneuploidías o preservación de la fertilidad), es benéfica porque se consigue mayor cantidad de óvulos en un mismo ciclo menstrual, mejora los desenlaces y acorta el tiempo de los procedimientos.

REFERENCIAS

1. Adams GP, et al. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* 2012; 78: 1733-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.010>
2. Jacob JC, et al. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 248-54. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01048.x>
3. Ginther OJ, et al. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 223-30. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870223>
4. Zhang J. Luteal phase ovarian stimulation following oocyte retrieval: is it helpful for poor responders. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 76. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0076-2>
5. Ubaldi FM, et al. Follicular *versus* luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation. *Fertil Steril* 2016; 105: 1488-95. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.002>
6. Kuang Y, et al. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reproductive BioMedicine Online* 2014; 29: 684-91. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.08.009>
7. Ferraretti AP, et al. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition, 2011. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011; 26 (7): 1616-24. <https://doi.org/10.1093/humrep/der092>
8. Alviggi C, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016; 105: 1452-3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.02.005>
9. Tsampras N, Gould D, Fitzgerald Ch. Double ovarian stimulation (Duostim) protocol for fertility preservation in female oncology patients. *Human Fertility* 2017; 20 (4): 248-253. doi: 10.1080/14647273.2017.1287433
10. Cakman H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP. Effective method for emergency fertility preservation: random – start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013; 100 (6): 1673-80. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1992
11. Martínez-Robles IM, González-Ortega C, Saavedra-Campos P, ChavarríaNoriega R, Pérez-Peña E, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Administración de hormona luteinizante recombinante (LHr) como protocolo de estimulación ovárica controlada en FIV-ICSI. *Ginecol Obstet Mex* 2016; 84 (10): 630-638.
12. Gutiérrez G AM, González OC, Cancino VP, Tovar CG, Garza MA, Pérez-Peña E. En: Delgado UJ, Fernández del Castillo C. *Ginecología y Reproducción Humana. Temas selectos. Capítulo: Micromanipulación de Gametos. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia* 2006; 46: 381-393.
13. González OC, Cancino VP, Pérez TA, Vargas MM, Martínez GS, Pérez Peña E, Gutiérrez G. Inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) vs inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) en pacientes con falla repetida a ICSI. *Ginecol Obstet Mex* 2010; 78: 652-659.
14. Cacchione TA, Herlihy N, Nazem TG, Gounko D, Lee J, Copperman AB. Fertility patients undergoing IVF for PGT-M require more oocyte retrievals than infertile counterparts, but achieve comparable outcomes. *Fertil Steril* 2018; 110(4): 145. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.07.428
15. Ubaldi F, Vaiarelli A, D'Anna R, Rienzi L. Management of poor responders in IVF: Is there anything new. *BioMed Research Int* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/352098>
16. Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage – stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013; 100: 624-630. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.039