



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA**

**INDICACIONES Y RESULTADOS DE CICLOS DE FIV/ICSI CON PROTOCOLO  
DE ESTIMULACIÓN EN FASE FOLICULAR Y FASE LÚTEA (DUOSTIM)**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

PRESENTA

**DRA. MIRIAM YUSELY SÁNCHEZ TAFOYA**

ASESOR

**DR. ANTONIO M. GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ**

LEÓN, GUANAJUATO, MEXICO, OCTUBRE 2021.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **CARTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS**

Por medio de la presente informamos que la C. Miriam Yusely Sánchez Tafoya, residente de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana ha concluido la escritura de su tesis “**Indicaciones y resultados de ciclos de FIV/ICSI con protocolo de estimulación en fase folicular y fase lútea (DuoStim)**”, y otorgamos la autorización para la presentación y defensa de la misma.

---

**Dr. Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez**

Director General Instituto de Ciencias en Reproducción Humana

---

**Dra. María Cristina Lanuza López**

Jefe de Enseñanza Instituto de Ciencias en Reproducción Humana

---

**Dr. Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez**

Asesor clínico y metodológico de tesis

## **DEDICATORIA**

**“trabajar duro por algo que no te importa se llama estrés. Trabajar duro por algo que te importa de verdad se llama pasión”**

**-Simon Sinek-**

La palabra pasión define estos años de preparación, que han sido arduos, llenos de ilusiones, llenos de aprendizaje, conocimientos, muchas alegrías y muchas satisfacciones, agradecimiento con la vida, por la fortuna que tenemos por haber llegado hasta aquí, por las excelentes personas que hemos encontrado en el camino.

Dios te agradezco por la vida que me has dado, por la familia que tengo, por la profesión más hermosa y apasionante que pude encontrar, por la bendición de vivir.

Agradezco con el corazón, a mis padres a los cuales tengo la fortuna de tenerlos en vida, por que todos sus esfuerzos en mi educación han sido valorados y gracias a ustedes, a su amor y a su confianza puesta en mi, he logrado llegar hasta aquí.

Mi esposo piedra angular en mi vida, puedo decir que la persona que más me ha impulsado y ha creído en mi, que siempre está y espero que siempre esté presente para el resto de nuestras vidas.

Mi hijo que a su corta edad me enseña día a día a observar maravillada que cada día tiene una nueva enseñanza y que si estamos unidos en familia “todo estará bien”. Por cierto eres mi energía, mi luz, mi motor, mi todo.

Agradezco también a todas las personas que han contribuido en mi formación Gracias Instituto Vida por abrirme las puertas de la enseñanza, se que mejor escuela no pude elegir,

mejor maestro no pude tener Dr. Antonio Gutiérrez Gutiérrez, a quién admiro y respeto, al gran equipo de embriología que tenemos Claudia Gonzalez, Patricia Cancino, Alejandra a mis adscritos y ahora amigos Dra. Cristina Lanuza, Dra. Lorena Ruvalcaba, Dr. Héctor Jaime Juarez, Dra. Ariana Ramírez, a mis compañeros, Eleana, Aldo, Lalo, a todas las personas que laboran en esta institución, Gracias infinitas.

Y no dejo de agradecer a todas las personas que de alguna manera siempre me han impulsado a seguir adelante, amigas, amigos, familiares, asesores en tesis, me faltaría espacio para mencionarlos a todos..Gracias.

## **ÍNDICE**

|   |    |
|---|----|
| 1. Dedicatoria.....                                   | 4  |
| 2. Marco teórico.....                                 | 8  |
| 3. Planteamiento del problema.....                    | 13 |
| 4. Justificación.....                                 | 15 |
| 5. Material y métodos.....                            | 16 |
| a. Diseño.....  | 16 |
| b. Pregunta investigación.....                        | 16 |
| c. Objetivo general.....                              | 16 |
| d. Objetivos específicos.....                         | 16 |
| e. Criterios inclusión.....                           | 16 |
| f. Criterios de exclusión.....                        | 17 |
| g. Criterios eliminación.....                         | 17 |
| h. Población de estudio.....                          | 17 |
| 6. Metodología de la investigación.....               | 18 |
| a. Estimulación ovárica.....                          | 18 |
| b. Inyección intracitoplásmica de espermatozoide..... | 19 |
| c. Cultivo embrionario.....                           | 20 |
| d. Biopsia embrionaria.....                           | 20 |
| e. Preparación endometrial ciclo natural.....         | 21 |
| f. Preparación endometrial ciclo sustituido.....      | 22 |
| g. Transferencia embrionaria.....                     | 23 |
| 7. Especificación de las variables.....               | 23 |
| 8. Análisis estadístico de la información.....        | 24 |
| 9. Aspectos éticos.....                               | 25 |
| 10. Resultados.....                                   | 26 |
| 11. Discusión.....                                    | 33 |
| 12. Conclusiones.....                                 | 38 |
| 13. Bibliografía .....                                | 39 |

## ÍNDICE DE TABLAS

| <b>Tema</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Tabla 1 Características demográficas de las pacientes.....           | 27            |
| Tabla 2 Desenlaces clínicos en pacientes sometidas a DuoStim.....    | 28            |
| Tabla 3 Resultados pacientes DuoStim sin PGT-A.....                  | 28            |
| Tabla 4 Resultados pacientes con PGT-A .....                         | 29            |
| Tabla 5 Resultados pacientes preservación de la fertilidad.....      | 29            |
| Tabla 6 Resultados reproductivos en pacientes DuoStim sin PGT-A..... | 30            |
| Tabla 7 Resultados reproductivos en pacientes DuoStim con PGT-A..... | 32            |

## INDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Protocolo Shaghaí en DuoStim.....                         | 11 |
| Figura 2 Protocolo Ubaldi DuoStim.....                             | 12 |
| Gráfico 1 Desenlaces clínicos pacientes con DuoStim sin PGT-A..... | 31 |
| Gráfico 2 Desenlaces clínicos pacientes con DuoStim con PGT-A..... | 32 |



## MARCO TEÓRICO

La prevalencia mundial de infertilidad primaria y secundaria se estima en 2 y 10.5 % respectivamente, entre mujeres de 20 a 44 años que intentan concebir<sup>1</sup>. Estas mujeres que ingresan a programas de fertilización in vitro (FIV) pueden ser clasificadas como pacientes con mal pronóstico por varias causas, se ha reconocido que para definir la mala respuesta en FIV deben estar presentes al menos dos de las siguientes tres características: edad materna avanzada, una prueba de reserva ovárica anormal, o ciclos previos de estimulación con mala respuesta; esto representa un 5 a 24 % de las pacientes que ingresan a protocolos FIV. Para estas pacientes adaptar un protocolo de estimulación ovárica para maximizar la cantidad de ovocitos recolectados representa un paso crucial y un verdadero reto<sup>2</sup>.

El primer embarazo de FIV exitoso del mundo se produjo después de la FIV en ciclo natural, que dio como resultado el primer nacimiento el 25 julio de 1978, de Louise Brown<sup>3</sup>. Los protocolos de inducción de ovulación fueron mejorando a través de los tiempos pasando del uso de citrato de clomifeno a las gonadotropinas urinarias. A mediados de los ochentas aparecen los protocolos con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); a principios de los noventas se contó con el advenimiento de las gonadotropinas altamente purificadas y recombinantes, hacia finales de los 90's el uso de los antagonistas de la hormona GnRH. Todas estas innovaciones y cambios, han logrado aumentar la tasa de embarazo a través de la estimulación folicular y posterior transferencia embrionaria, hasta llegar a la era de la FIV convencional<sup>4</sup>, posterior a ello el avance con mejoras en las técnicas de criopreservación brindaron un gran aporte a pacientes con infertilidad, mejorando sus posibilidades de embarazo. Estos avances han permitido aumentar las posibilidades reproductivas en las pacientes que cursan con infertilidad, y gracias a los descubrimientos en las últimas décadas sobre la existencia de múltiples ondas foliculares, es que se ha permitido explorar y utilizar un tipo de estimulación ovárica controlada y novedosa que corresponde a una no convencional y que da la entrada a nuevos tipos de protocolos prometedores para pacientes con infertilidad. Todo lo anterior ha representado un gran esfuerzo para perfeccionar las técnicas de FIV. Con respecto a esto, un enfoque individualizado de cada pareja ha sido fundamental para muchos especialistas en reproducción. Por un lado, las pacientes con una respuesta alta o normal esperada a la estimulación ovárica podrían beneficiarse de estrategias validadas y reproducibles, por otro lado, el manejo de pacientes con mal pronóstico sigue siendo un desafío, por ello en los

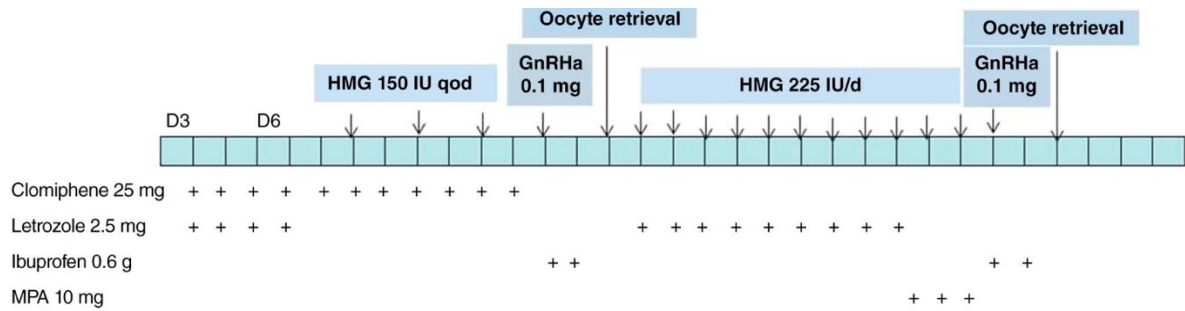
últimos años han surgido nuevos protocolos para la estimulación ovárica encaminados a aumentar las probabilidades de éxito para estas pacientes<sup>5,6</sup>. En la última década, el aumento en el conocimiento del dinamismo extremo de la foliculogénesis, así como los avances innovadores de los laboratorios de FIV (por ejemplo, cultivo embrionario extendido, pruebas de aneuploidía y el perfeccionamiento en las técnicas vitrificación), ha permitido el desarrollo de técnicas de reproducción novedosas, no convencionales. Lo anterior ha dado la posibilidad de observar avances en el manejo de poblaciones de pacientes con pobre pronóstico reproductivo. La doble estimulación en un mismo ciclo ovárico (DuoStim), se considera actualmente como uno de los avances más prometedores<sup>7</sup>.

Actualmente se conoce que el proceso de selección ovocitaria es extremadamente dinámico<sup>8</sup>. Existen varias teorías que han sido modificadas a través del tiempo, la primera de ellas hace referencia a la teoría del episodio de reclutamiento folicular único, donde existe una sola cohorte de folículos antrales que crecen durante la fase folicular del ciclo ovárico, inmediatamente después de la fase lútea<sup>9</sup>. Otra de las teorías se refiere al reclutamiento continuo, en la que los consecutivamente aparecen folículos que crecen y tienden a la regresión durante el ciclo ovárico<sup>10</sup>. La teoría de las olas, en la cual se reclutan 2 a 3 cohortes de folículos antrales por ciclo ovárico<sup>11</sup>. Estudios recientes sugieren que en mujeres que presentan ciclos menstruales más largos se observa una tercera ola de crecimiento folicular, lo cual puede ser demostrado a través de una exploración ecográfica vaginal<sup>12</sup>.

En la actualidad existen diversos tipos de protocolos en terapia de reproducción asistida, todos ellos adaptados a las necesidades de cada pareja y con el mismo objetivo: obtener una mayor cantidad de óvulos, para mejorar las posibilidades de tener un mayor número de embriones, poder lograr el embarazo y llevar un recién nacido vivo a casa<sup>13</sup>. Esto no sería posible si no se contara con un gran avance en las técnicas de criopreservación<sup>14</sup>. En la actualidad las técnicas de criopreservación son muy efectivas, no solo hablando de vitrificación de embriones, sino también en exitosos resultados en vitrificación de ovocitos humanos, como lo muestran Peter Nagy y colaboradores en 2017 donde encuentran evidencia significativa a favor de las técnicas de criopreservación en ovocitos humanos versus congelación lenta, encontrando resultados favorables en las tasas de nacidos vivos<sup>15</sup>.

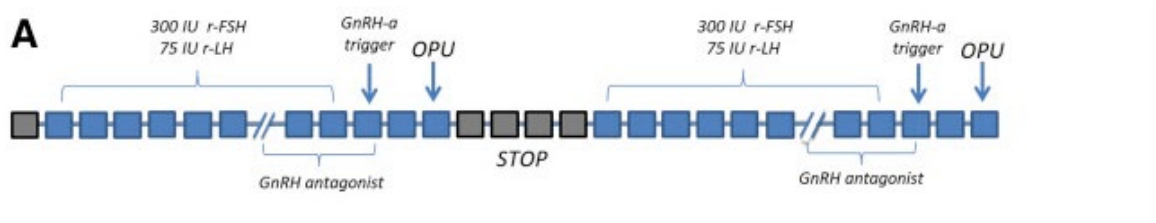
Por lo anterior se ha propuesto una nueva estrategia de estimulación ovárica controlada (EOC): doble estimulación en el mismo ciclo ovárico. La primera experiencia con la doble estimulación fue reportada por Yanping Kuang y colaboradores en 2014, conocida como protocolo de Shanghai, quien demostró que la calidad de los embriones obtenidos en fase folicular y lútea era similar bajo estimulación ovárica mínima, logrando resultados equiparables en un grupo de pacientes con pobre pronóstico reproductivo<sup>16</sup>. En este protocolo, las pacientes fueron evaluadas mediante ecografía transvaginal y pruebas de hormona folículo estimulante (FSH) en suero el día 3 de su ciclo menstrual. Se administraron citrato de clomifeno 25 mg / día, en conjunto con letrozol 2,5 mg / día, desde el día 3 del ciclo en adelante. El letrozol solo se administró durante 4 días y el citrato de clomifeno se utilizó de forma continua hasta el día del disparo de ovulación. Las pacientes comenzaron a inyectarse 150 UI de gonadotropina menopáusica humana (HMG) en días alternos a partir del día 6 del ciclo. La monitorización folicular comenzó el día 10 del ciclo y se llevó a cabo cada 2 a 4 días mediante una ecografía transvaginal, para registrar el número de folículos en desarrollo, se realizaron mediciones de las concentraciones séricas de FSH, hormona luteinizante (LH), estradiol y progesterona cuando uno o dos folículos dominantes alcanzaron los 18 mm de diámetro, la etapa final de la maduración de los ovocitos se indujo con triptorelina 0,1 mg, seguida de ibuprofeno 600 mg que se utilizó el día del disparo de la ovulación y el día siguiente, para prevenir la posible ovulación del folículo antes de la recuperación de los ovocitos.

La aspiración de ovocitos guiada por ecografía transvaginal se realizó 32 a 36 horas después de la administración del agonista de GnRH. Dejando los folículos de menos de 10 mm sin puncionar, esperando la siguiente etapa. En la estimulación en fase lútea (EFL), se administró letrozol 2,5 mg / día y HMG 225 UI / día, ambos a partir del día de la primera recuperación de ovocitos, o un día después y hasta el segundo desencadenamiento de la ovulación. También se administró acetato de medroxiprogesterona (MPA), si la estimulación se prolongaba posterior al día 12. Para ambas estimulaciones, la ovulación se desencadenó con triptorelina 0,1 mg cuando finalmente se logró la maduración folicular. <sup>14</sup>



**Figura 1.** El protocolo de doble estimulación durante las fases folicular y lútea en pacientes con mala respuesta ovárica. GnRHa, agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas; HMG, gonadotropina menopáusica humana; MPA, acetato de medroxiprogesterona. (Fuente: Kuang Y, Chen Q, Hong Q, Lyu Q, Ai A, Fu Y, Shoham Z. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reprod Biomed Online*. 2014.)

En 2016, Filippo Maria Ubaldi y colaboradores publicaron un concepto que describe la primera aplicación de DuoStim con protocolo de estimulación convencional con antagonista de GnRH a dosis fija de r-FSH 300 UI / día, combinada con r-LH 75 UI / día, tanto en estimulación fase folicular (EFF), como en estimulación fase lútea (EFL), en 51 pacientes con mal pronóstico: hormona antimülleriana [AMH] <1,5 ng / ml, conteo folicular <6, y / o <5 ovocitos recuperados en ciclos previos de FIV. sometidos a inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) y estudio genético preimplantacional para aneuploidias (PGT-A). Se realizó disparo de la ovulación con agonista de GnRH con el objetivo de reducir la vida media del cuerpo lúteo después de la recolección de ovocitos y facilitar el reclutamiento de folículos de la fase lútea. Dentro de sus resultados no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en términos de número de ovocitos MII recuperados, fertilización, blastocisto y tasas de blastocistos euploides, entre estimulación en fase folicular y estimulación en fase lútea. En consecuencia, DuoStim aumentó el rendimiento final de blastocistos transferibles por ciclo ovárico con respecto a solo la estimulación en fase folicular<sup>17</sup>.



**Figura 2.** Protocolo de doble estimulación DuoStim. Cinco días después de la primera recuperación ovocitaria, se realizó estimulación de la fase lútea con protocolo idéntico, cada cuadro representa un día del ciclo. (fuente: Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Colamaria S, Alviggi C, Trabucco E, Venturella R, Vajta G, Rienzi L. 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 Jun.)

En otro estudio piloto publicado en 2017 por Nikolaos Tsampras y colaboradores, probaron la eficacia de la doble estimulación para la preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas. Diez pacientes se sometieron a doble estimulación con antagonista de la GnRH y protocolo con HMG. Este protocolo aumentó el número de ovocitos recuperados y vitrificados, sin retrasar el tratamiento del cancer.<sup>18</sup> En la actualidad además de poder realizar protocolo DuoStim en pacientes oncológicas también se puede realizar preservación de la fertilidad con estimulación ovárica de inicio aleatorio sobre todo en entornos de tiempo limitado logrando excelentes resultados.<sup>19</sup>

Por lo anterior podemos establecer que algunas de las principales indicaciones de DuoStim son: pacientes con baja reserva ovárica (BRO), con la finalidad de obtener mas ovocitos en el menor tiempo<sup>20,21,22</sup>, también pacientes de edad avanzada las cuales son consideradas a partir de los 35 años de edad, encontrando una disminución en el recuento folicular y a su vez disminución de la calidad ovocitaria en comparación con mujeres menores de 35 años de edad<sup>23</sup>. Dichas pacientes pueden favorecerse al realizar estudio genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) como una excelente estrategia que aumenta la posibilidad de transferir un embrión euploide, ya que la incidencia de anomalías cromosómicas aumenta de un 25% en mujeres menores de 35 años, hasta un 65% en mujeres mayores de 40 años<sup>24,25,26</sup>. Además de las indicaciones descritas previamente, la

preservación de la fertilidad ya sea social o por un diagnóstico oncológico pueden ser indicación de DuoStim. Existen pacientes oncológicas con necesidad urgente de iniciar tratamiento médico ó quirúrgico, y al no contar con tiempo para estimulaciones convencionales, se puede recurrir a una doble estimulación, y así poder optimizar una mayor obtención de óvulos en un periodo de tiempo más corto.

Independientemente de conocer las indicaciones de la utilización de DuoStim es importante tener presente que existen claros beneficios al utilizar este tipo de protocolo, acortando el tiempo entre la primera y la segunda recuperación ovocitaria (15.8 días en DuoStim frente a 141.4 días estimulación ovárica controlada con protocolos convencionales), reduce el tiempo necesario para obtener blastocistos euploides y mejorar las posibilidades de éxito<sup>27</sup>, y evita la interrupción del tratamiento en pacientes que tuvieron una mala respuesta en estimulación convencional<sup>28, 29</sup>.

Estudios recientes que exploran el valor de múltiples oleadas foliculares demuestran la superioridad de la estimulación en fase lútea al obtener mayor número de óvulos que los obtenidos en fase folicular estándar<sup>30,31</sup>. Sin embargo, también existe literatura reciente donde se compara la similitud estadística con respecto a la obtención de ovocitos metafase dos (MII), tasa de embriones euploides, tasa de gestación y tasa de nacidos vivos en estimulación en fase folicular vs fase lútea.<sup>32</sup>

En la actualidad, la literatura carece de datos sólidos que puedan ayudar a los médicos a explorar el concepto de la doble estimulación y adoptar de manera segura la recuperación de ovocitos en fase lútea en la práctica clínica. Es imperativo que se brinde información sobre los beneficios de este tipo de protocolo para permitir una mejor implementación de dicho protocolo, por ello la necesidad de poder analizar algunos de nuestros resultados y la experiencia que tenemos en nuestro centro de reproducción en pacientes a las cuales hemos realizado estimulación en fase folicular y estimulación en fase lútea (DuoStim).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las técnicas de reproducción asistida y su evolución, han sido una herramienta indispensable en el tratamiento de la infertilidad. Sin embargo, los cambios que enfrentamos como sociedad, tales como el deseo de aplazar la maternidad por cuestiones académicas, profesionales, diagnóstico de enfermedades de rápida evolución, o incluso por que la pareja no desea cursar con un embarazo a corto plazo, se convierten en factores limitantes y

negativos para lograr un embarazo. Por ello necesario evaluar, perfeccionar e individualizar los protocolos de estimulación ovárica controlada, así como la tecnología para poder brindar posibilidades a estas parejas en un futuro y así la obtención de un embarazo en curso.

En los últimos años, el uso del protocolo DuoStim, como una herramienta innovadora, ha mostrado eficacia en pacientes con baja reserva ovárica, permitiendo aumentar el número de blastocistos obtenidos; y en pacientes de edad avanzada, una mayor probabilidad de obtener un embrión euploide; lo cual impacta positivamente en los resultados reproductivos de las pacientes que lo requieran.

El planteamiento anterior es la base para la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen similitud entre los resultados reproductivos de embriones obtenidos con protocolo de estimulación en fase folicular vs fase lútea?

## JUSTIFICACIÓN

En el protocolo de DuoStim, al combinar la estimulación de la fase folicular convencional, con la estimulación de la fase lútea, puede considerarse una opción valiosa para maximizar el número de ovocitos recuperados en un solo ciclo ovárico. Este protocolo también puede ser utilizado en pacientes que no recolectaron ovocitos o no produjeron embriones competentes después de la estimulación en fase folicular, otra implementación podría ser para pacientes que desean realizar preservación de la fertilidad y no disponen de tiempo y/o que además presentan una disminución en su reserva ovárica. Esta estrategia no solo aumenta el número de ovocitos obtenidos, sino que también aumenta el número de blastocistos competentes por ciclo ovárico<sup>33</sup>, y puede reducir la tasa de abandono después de un ciclo de fertilización in vitro fallido. Sin embargo, la ausencia de ensayos controlados y aleatorizados y falta de pruebas sobre la seguridad y la rentabilidad generan preocupaciones importantes. Aunque se cuenta con estudios donde los hallazgos iniciales de resultados obstétricos y neonatales donde los embriones obtenidos de EFF y EFL justifican la seguridad de su uso, reportando ser factible y eficiente desde la perspectiva clínica, obstétrica y perinatal.

Debido a que no existe en la actualidad un estudio realizado en población mexicana sobre las indicaciones y los resultados obtenidos en mujeres sometidas a doble estimulación en un mismo ciclo ovárico, revisamos los resultados de nuestra población de pacientes con diferentes indicaciones para realización de protocolo DuoStim en centros de reproducción asistida en la ciudad de León Guanajuato y Tijuana Baja California.

En artículos recientes existe evidencia que al combinar la estimulación convencional en fase folicular con la EFL, puede considerarse una opción valiosa en pacientes con reserva ovárica reducida, edad materna avanzada y para pacientes sometidas a protocolos de preservación de la fertilidad, en todas ellas la finalidad es mejorar el futuro reproductivo, obteniendo mas óvulos y mas embriones.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Estudio observacional, retrospectivo, comparativo.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿cuáles son las indicaciones y resultados clínicos, de embriones obtenidos en fase folicular contra embriones obtenidos en fase lútea?

### **OBJETIVO GENERAL**

Comparar los resultados reproductivos de ciclos de FIV/ICSI con protocolo de estimulación en fase folicular y fase lútea (DuoStim), en pacientes candidatas a la doble estimulación.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar el número de ovocitos recuperados y maduros, obtenidos en fase folicular y en fase lútea.
- Comparar los días de estimulación en fase folicular contra los días en fase lútea.
- Evaluar y buscar diferencias entre el consumo de gonadotropinas durante la estimulación en fase folicular contra la estimulación en fase lútea.
- Determinar la tasa de gestación, implantación, tasa de aborto, tasa de embarazo bioquímico, tasas de embarazo en curso, y tasas de recién nacido vivo, en pacientes transferidas con embriones obtenidos de una estimulación en fase folicular contra los procedentes de estimulación en fase lútea.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Mujeres con baja reserva ovárica candidatas a acumulación ovocitaria.
- Mujeres con edad materna avanzada candidatas para realizar estudio genético preimplantacional para aneuploidías.
- Mujeres con deseo de preservación de la fertilidad.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Mujeres en ciclos de FIV/ICSI que no realizan doble estimulación.
- Mujeres en protocolo de óvulos donados.
- Mujeres que no firmaron consentimiento informado para realización de ciclo FIV/ICSI.

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Mujeres con mal apego al tratamiento o que no desean seguir participando en el programa de doble estimulación.
- Mujeres que abandonaron el tratamiento DuoStim.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Mujeres con infertilidad que requirieron estimulación ovárica controlada en fase folicular y lútea (Duostim) que acudieron a Instituto de Ciencias de Reproducción Humana sede León Guanajuato y Tijuana Baja California de febrero 2018 a junio 2021.

## **GRUPOS DE ESTUDIO:**

Para este estudio se incluyeron 3 grupos conformados de la siguiente manera:

- I. Grupo que realizó DuoStim sin PGTA
- II. Grupo que realizó DuoStim con PGT-A
- III. Grupo que realizó DuoStim para preservación de la fertilidad

## **SITIO DE REALIZACIÓN**

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

Instituto de Ciencias de Reproducción Humana del Noroeste, Tijuana B.C. México.

## **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO**

Para la realización de este estudio, se incluyeron 155 pacientes a las cuales se les realizó protocolo DuoStim, con la finalidad de obtener más óvulos para lograr una mayor cantidad de embriones para realizar una transferencia embrionaria y/o tener más embriones disponibles. Todas las pacientes tuvieron un protocolo completo de estudio de infertilidad que incluyó las siguientes pruebas hormonales: perfil ovárico basal (LH, FSH, estradiol, progesterona y prolactina), perfil tiroideo, (tiroxina, triyodotironina y hormona estimulante de tiroides), perfil infeccioso (anticuerpos contra VHB; VHC, VIH y VDRL), así como ultrasonido pélvico con recuento de folículos antrales en el día 2 de ciclo, y estudios de imagen como histerosalpingografía en algunas pacientes que lo requirieran. A la pareja se le solicitó espermatozoides directos y estudios de perfil infeccioso descrito previamente.

Una vez establecida la realización de un ciclo de hiperestimulación ovárica para FIV/ICSI, se decidió cuáles pacientes eran candidatas a DuoStim, éstas fueron las pacientes con indicación de BRO en las cuales se incluyó a 62 pacientes. Otro grupo importante se realizó en mujeres de edad avanzada a las cuales se les realizó DuoStim con PGT-A (87 pacientes), y por último un grupo de pacientes que se sometió a preservación de la fertilidad con baja reserva ovárica y/o con edad materna avanzada (6 pacientes).

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para la realización de protocolo de estimulación ovárica controlada y dentro de estas, 87 pacientes firmaron consentimiento para realización de PGT-A.

### **ESTIMULACIÓN OVÁRICA**

A todas nuestras pacientes se les administró valerato de estradiol 4 mg a partir del día 21 del ciclo previo. La primera etapa de la estimulación ovárica se inició del día 1 al 5 del ciclo una vez corroborado reposo ovárico. Utilizamos gonadotropinas recombinantes 300UI FSH/150UI LH<sup>34</sup> (Pergoveris, Merck) y en algunas de ellas una dosis extra de FSH recombinante de 75UI (Gonal F, Merck), con protocolo flexible con antagonista de la GnRH (acetato de Cetorelix 0.25mg, cetrotide, Merk Serono, Alemania) una vez que se encontraban folículos con dominancia en 14mm. El seguimiento folicular se realizó por ultrasonido endovaginal, la primera revisión fue el 5to día de inicio de la estimulación ovárica y después cada 3er día hasta observar dos o más folículos entre 17 y 18 mm, corroborando valores hormonales el

día del disparo de la ovulación y en base a ello determinando el tipo de disparo de la ovulación, administrando en pacientes altas respondedoras disparo de la ovulación con agonista de la GnRH (Acetato de Triptorelina 0.2 mg, Gonapeptyl Daily, Ferring, Kiel, Alemania) por vía subcutánea, para disminuir riesgo de hiperestimulación ovárica, en bajas respondedoras el disparo de la ovulación fue con hCG intramuscular 10,000ui (Choriomon, Corne, México) ó 250 mcg de hCGr (Ovidrel, Merk, Serono, Italia) vía subcutánea.

Se realizó punción transvaginal guiada con ultrasonido para captura ovular 36 a 38 horas después de la administración del disparo de la ovulación. Al 5° día posterior a la primera captura se reinició la estimulación ovárica con la misma dosis y el protocolo previamente descrito, de igual manera el disparo de ovulación se realizó con agonista de la GnRH o con hCG según la respuesta de cada paciente. Durante las aspiraciones foliculares, se obtuvieron todos los folículos visibles.

### **INYECCIÓN INTRACITOPLÁSMICA DE ESPERMATOZOIDES**

Previo al proceso de inyección intracitoplasmática, las placas fueron preparadas 24 hrs antes de la microinyección dentro de la cabina de flujo laminar y puestas dentro del incubador trigas Miri™ (ESCO medical) a 37° C a una concentración de 6 % de CO<sup>2</sup>, 5% de O<sup>2</sup> y un pH de 7.2-7.3 el cual fue analizado con gasómetro Epoc™ (Siemens).

### **TECNICA DE ICSI**

La inyección intracitoplásmica de espermatozoides se efectuó con un microscopio invertido Olympus IX71 equipado con inyectores Eppendorf Celltram Air y Celltram Vario.

Brevemente, una vez decumulados los ovocitos, se seleccionaron únicamente los que estuvieron en metafase II para ser microinyectados. Los espermatozoides se seleccionaron con una magnificación de 400x con modulación de Hoffman. Bajo esta magnificación se seleccionaron los espermatozoides con movilidad progresiva o no progresiva con apariencia morfológica normal, se excluyeron en lo posible aquellos espermatozoides con alteraciones morfológicas severas (amorfo, redondo, multinucleado, etc.).

La fertilización se confirmó por la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares a las 17 horas después de la microinyección. Los cigotos con una adecuada fertilización se cambiaron a medio de cultivo fresco cada 48 horas.

Los embriones se clasificaron como excelentes cuando presentaron en día 2 menos de 10% de fragmentación y cuatro blastómeras simétricas, sin multinucleación y en día 3 menos de 10% de fragmentos y ocho blastómeras simétricas, usando la escala Veeck en el caso de blastocistos, estos fueron evaluados utilizando la clasificación de Gardner y Schoolcraft tomando en cuenta calidad y grado de expansión de las células del trofoectodermo (TE), así como la cohesividad y calidad de la masa celular interna (MCI). Los blastocistos en grado 3 – 5 de expansión, con una MCI y trofoectodermo grado A o B en día 5, fueron considerados de excelente calidad<sup>35</sup>.

### **CULTIVO EMBRIONARIO**

Tras la decumulación ovocitaria se realiza fertilización de los ovocitos con inyección intracitoplasmática de espermatozoide descrita por Palermo<sup>36</sup>, la fecundación fue evaluada de 16-20 hrs post inyección. El cultivo embrionario se realizó con medio continuo Global Total LP (Life Global) desde cigoto a blastocisto de día 5 y/o 6 en una atmósfera de 6.6% CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> y un pH de 7.25.

### **BIOPSIA EMBRIONARIA**

Además, en los embriones candidatos a realización de estudio PGT-A en el día 4 del desarrollo embrionario se llevó a cabo la perforación de la zona pelúcida en los embriones con el uso de laser OCTAX Lasershot 2.2ms (20 m), para permitir la eclosión del trofoectodermo. Los embriones que no serían analizados genéticamente se vitrificaron en base a su morfología en día 3, 5 o 6. Mientras los ovocitos obtenidos en protocolo de preservación de la fertilidad, fueron vitrificados el mismo día de la aspiración ovular.

Para la realización del estudio genético preimplantatorio para aneuploidía de los embriones candidatos a biopsia embrionaria se llevó a cabo en embriones de día 5, 6 o 7, los embriones que fueron aptos para la biopsia fueron colocados en una placa preparada el mismo día de la biopsia con medio HTF Hepes suplementado con albúmina sérica humana al 5 % en gotas independientes y cubiertas con Parafina líquida (LifeGlobal) y las placas colocadas en una superficie caliente a 37° C. El método de la biopsia embrionaria fue hecha sobre un microscopio invertido Olympus IX71 equipado con inyectores Eppendorf Celltram Air y Celltram Vario usando manipuladores hidráulicos Narashige (Tokio, Japón) y Eppendorf en una superficie caliente a 37° C. Se tomaron de 5 a 10 células de trofoectodermo para llevar a cabo el análisis PGT- A, se realizaron 3 disparos con OCTAX

Lasershot 3.2 milisegundos para después hacer el corte de las células frotando las pipetas entre sí, las células se depositaron en tubos para PCR y se enviaron al laboratorio Vida Genetics (León, Guanajuato, México) para su análisis. Todos los blastocistos biopsiados fueron vitrificados bajo la técnica de Kitazato descrita por Kuyawama en 2007<sup>37</sup>, de manera individual en espera del resultado del estudio.

Posterior a la realización de la toma de biopsias embrionarias, estas fueron analizadas mediante secuenciación masiva para la realización del PGT-A. El ADN de las biopsias embrionarias fue amplificado mediante la técnica de *Whole Genome Amplification* (WGA) con el uso del kit Ion SingleSeq (Thermo Fisher Scientific, USA). Posteriormente, el ADN obtenido fue sometido a una amplificación isotermal y para la secuenciación se utilizó el secuenciador Ion Torrent™ PGM. Siguiendo las especificaciones del protocolo Ion ReproSeq™ PGS Kits (Thermo Fisher Scientific, USA). El análisis del número de copias se realizó con el Software Ion Reporter (versión 5.10.5) (Thermo Fisher Scientific, USA) mediante el Workflow ReproSeq Mosaic PGS w1.1.

## **PREPARACIÓN ENDOMETRIAL EN CICLO NATURAL**

Antes de realizar la transferencia embrionaria (TE) se preparó a cada paciente de manera personalizada, a las pacientes con ciclos regulares se les revisó dentro de los días 10 a 12 posterior al inicio de su periodo menstrual, con la finalidad de valorar el grosor endometrial al igual que el desarrollo folicular, una vez realizada la primera revisión ultrasonográfica se determinó cada 48 a 72 horas su seguimiento y la obtención de valores de estradiol, hormona luteinizante y progesterona una vez alcanzado un folículo preovulatorio mayor 17 mm.

Los criterios para el disparo de la ovulación con hCG fueron: medida de folículo dominante al menos de 17 mm, endometrio de aspecto ultrasonográfico trilaminar mayor a 7 mm, progesterona sérica menor 1 ng/mL, niveles de estradiol sérico mayor a 150 pg/mL, valor de LH menor de 10 mUI/mL.

Una vez que se lograron los criterios para disparo de ovulación se administró 5 000 UI de hCG (Choriomon, Corne, México) o 250 mcg de hCGr (Ovidrel, Merk Serono, Italia), solo se realizaban cancelaciones del ciclo en caso de presentar valores de progesterona sérica

por encima de 1 ng/mL. La administración vaginal de progesterona se realizó con 200 mg (endometrin, Ferring, Kiel, Alemania) ó con 400 mg de progesterona micronizada (Geslutin, Asofarma, México) dos días después de la administración de hCG, la transferencia embrionaria se programó 6 días después del inicio de la administración de la progesterona, al ser transferidos embriones de día 5 (con o sin estudio genético) mientras que para los embriones transferidos en día 3, se administró previamente 4 días de progesterona, la prueba de embarazo se realizó 13 días posteriores a la transferencia si los embriones fueron de día 5, mientras que si fueron embriones de día 3 la prueba de embarazo se realizó 15 días después de la transferencia embrionaria. En todos los casos de transferencias si la prueba de embarazo fue positiva, se continuó la suplementación de progesterona vaginal hasta la semana 12 de gestación.

### **PREPARACIÓN ENDOMETRIAL EN CICLO SUSTITUIDO**

A las pacientes que se les realizó transferencia embrionaria en ciclo sustituido se les realizó la administración de agonista de la GnRH de depósito (acetato de Triptorelina, Gonapeptyl Depot 3.75mg, Ferring, Kiel, Alemania) en el día 21 del ciclo previo a la preparación endometrial y en pacientes anovulatorias se inició la administración de estrógenos exógenos a partir del primer día de menstruación posterior a deprivación endometrial.

Tras el inicio de la menstruación en ambos casos se administró valerato de estradiol (Primogyn 2 mg, Bayer Pharma, Weimar, Alemania), en dosis escalonadas que inician con 4 mg vía oral cada 24 hrs con incrementos de 2 mg cada 3 días, hasta alcanzar una dosis de 8 mg cada 24 hrs, posterior se citó a valoración ultrasonográfica a los 12 días posterior al inicio del tratamiento, donde se realiza un ultrasonido transvaginal ultrasonográfico y se corrobora la ausencia de folículo dominante ovárico, además del grosor endometrial alcanzado.

Para el inicio de administración de progesterona se tomaron como criterios endometrio de aspecto ultrasonográfico trilaminar mayor a 7 mm, ausencia de desarrollo folicular ovárico y en caso de presencia de dominancia folicular un valor sérico de progesterona menor a 1 ng/mL.

Se realizó cancelación de ciclo en caso de endometrio menor de 7 mm y/o progesterona sérica mayor a 1 ng/mL.

Se aplicó progesterona intramuscular (Progesterona en aceite 50 mg, Actaris, EUA) cada 24 horas una vez que se lograron los criterios establecidos, la transferencia embrionaria se programó 6 días después del inicio de la progesterona al ser transferidos embriones de día 5 (con o sin estudio genético), mientras que para los embriones transferidos en día 3, se administró previamente 4 días de progesterona intramuscular, la prueba de embarazo se realizó 13 días posteriores a la transferencia si los embriones fueron de día 5, mientras que si fueron embriones de día 3 la prueba de embarazo se realizó 15 días después de la transferencia embrionaria. En todos los casos de transferencias si la prueba de embarazo fue positiva, se continuó la suplementación de progesterona intramuscular hasta la semana 12 de gestación.

### **TRANSFERENCIA EMBRIONARIA**

La transferencia embrionaria (TE) fue realizada en ciclos naturales o mediante administración de estrógenos, esto se individualizó según la regularidad menstrual de cada paciente. Los embriones fueron clasificados de mejor calidad fueron seleccionados para ser transferidos en día 3 o en día 5, en las pacientes que no realizaron estudio genético para aneuploidías. Para las pacientes con indicación de PGT-A se seleccionó un embrión euploide en base a la calidad embrionaria. La técnica se llevó a cabo con guía ultrasonográfica, utilizando un catéter de Frydman ultrasoft o Wallace. Las pacientes se quedaron en reposo durante 1 hora después de la TE. Se utilizó soporte lúteo con progesterona en todos los casos, el cual se individualizó según la preparación endometrial.

La prueba de fracción beta hGC se realizó a los 14 días posteriores a la TE. El embarazo clínico se definió como la presencia de latido cardiaco fetal por ultrasonido a las 6-7 semanas.

### **ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES**

Para la estimación de las tasas se utilizaron las siguiente fórmulas:

- Tasa de gestación por transferencia realizada es equivalente al número pruebas positivas entre número de pacientes transferidas.
- Tasa de embarazo clínico por transferencia. Número de gestaciones con latido cardiaco fetal entre el número de transferencias realizadas.



- Tasa de implantación es equivalente al número de sacos gestacionales entre número de embriones transferidos.
- Tasa de embarazo bioquímico es equivalente al número de embarazos bioquímicos entre número de pruebas positivas.
- Tasa de aborto es equivalente al número de abortos entre número de embarazos clínicos con frecuencia cardíaca fetal.
- Tasa de recién nacido vivo es equivalente al número partos o cesáreas con al menos un nacido vivo entre el número de ciclos o bien número de transferencias realizadas.
- Tasa de embarazo en curso es equivalente al número de embarazo en curso entre número de sacos gestacionales<sup>38</sup>.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cuantitativas fueron expresadas como media y desviación estándar, mientras que las variables cualitativas fueron expresadas como frecuencias y porcentajes.

Para la comparación de variables cuantitativas entre los dos protocolos de estimulación se utiliza la prueba de *t-student*. La comparación de frecuencias y porcentajes entre grupos se realizó utilizando la Prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS statistics 19 para windows. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, en el Capítulo I de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, en su artículo 17, el presente estudio se clasifica en:

1.- Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participen en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en lo que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

Al ser un estudio de tipo descriptivo, no se realizó intervención en la exposición y evolución del padecimiento estudiado. Este estudio está clasificado como una investigación sin riesgo.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para el procedimiento de FIV/ICSI, además a las pacientes a las que se les realizo PGT-A firmaron un consentimiento específico para dicho estudio

## RESULTADOS

En este estudio fueron incluidas un total de 155 pacientes, 62 pacientes sometidas a protocolo de doble estimulación sin PGT-A por baja reserva ovárica. 87 pacientes corresponden al grupo de DuoStim con PGT-A,. Por edad materna avanzada y por baja reserva ovárica, y por último un grupo de 6 pacientes que realizaron DuoStim a las cuales se les realizó preservación de la fertilidad también con edad materna avanzada y algunas con baja reserva ovárica.

La tabla 1, describe las principales características de las pacientes incluidas en el estudio. Las pacientes presentaron una media de edad de  $38.3 \pm 4.1$ . La edad mínima de las pacientes fue de 29 años mientras que la edad máxima fue de 49 años. En cuanto al tipo de infertilidad por el cual las pacientes ingresaron al protocolo, se observó que un 69.6% (n=108) fue por infertilidad primaria, mientras que un 30.3% (n=47) lo hicieron por infertilidad secundaria. Los diagnósticos presentes en la población de estudio fueron baja reserva ovárica se presentó en 41.6% (n=65), seguido de edad materna avanzada 20.6%(n=30), factor tubario 17.4% (n=27). Además, el factor masculino correspondió a un 7.01% (n=11) de las causas de inclusión de las pacientes. Pacientes con pérdida gestacional recurrente y falla repetida de la implantación corresponde a un 4.5% (n=7) ambas. Pacientes con síndrome de ovario poliquístico 2.5% (n=4) y otros diagnósticos incluidos 1.9% (n=2). En lo referente a los niveles hormonales, los niveles basales promedio de hormona folículo estimulante (FSH) fueron de  $8.3 \pm 3.2$  mUI/mL mientras que los de hormona luteinizante (LH) fueron  $6.8 \pm 2.8$  mUI/ml.

**Tabla 1. Características demográficas de las pacientes incluidas en el estudio de manera global.**

| Variable                                | n=155            |
|---|------------------|
| Edad (años) <sup>a</sup>                | 38.3 ± 4.05      |
| Edad (años) <sup>b</sup>                | 28-49            |
| Menor a 35 años, n (%)                  | 30 (31.9 ± 1.84) |
| 35 a 39 años, n (%)                     | 52 (37.5 ± 1.43) |
| 40 a 44 años, n (%)                     | 70 (41.3 ± 1.37) |
| 45 años o más, n (%)                    | 3 (47.6 ± 2.30)  |
| Diagnostico                             |                  |
| - Infertilidad primaria, n (%)          | 108 (69.6)       |
| - Infertilidad secundaria, n (%)        | 47 (30.3)        |
| - Falla de implantación, n (%)          | 7 (4.5)          |
| - Baja reserva ovárica, n (%)           | 65 (41.6)        |
| - Factor masculino, n (%)               | 11 (7.01)        |
| - Factor tubario, n (%)                 | 27 (17.4)        |
| - Edad materna avanzada, n (%)          | 32 (20.6)        |
| - Síndrome ovario poliquístico, n (%)   | 4 (2.5)          |
| - Pérdida gestacional recurrente, n (%) | 7 (4.5.)         |
| - Otro, n (%) <sup>*</sup>              | 2 (1.9)          |
| FSH (mUI/mL) <sup>a</sup>               | 8.2 ± 3.2        |
| LH (mUI/ mL) <sup>a</sup>               | 6.8 ± 2.8        |

<sup>a</sup> Las variables cuantitativas fueron expresadas como medias y desviación estándar. Las variables cualitativas fueron expresadas como frecuencias y porcentajes. <sup>b</sup> Variable expresada como mínimo y máximo. <sup>\*</sup>Otro: PGTM (estudio genético preimplantacional para monosomías).

En la tabla 2, se muestra una comparación fase folicular contra fase lútea de los desenlaces clínicos de forma global en las pacientes con DuoStim. En esta tabla no se incluyen las pacientes con preservación de la fertilidad. Los días de estimulación fueron mayores en la fase lútea comparado con la fase folicular ( $10.1 \pm 1.8$  vs  $10.9 \pm 2.1$ ;  $p < 0.001$ ), además, las dosis de FSH ( $3342.8 \pm 912.6$  vs  $3702.8 \pm 968.3$ ;  $p = 0.003$ ) y LH fueron mayores en la estimulación de fase lútea ( $1499.3 \pm 381.5$  vs  $1664.9 \pm 384.0$ ;  $p = 0.001$ ). En el resto de las variables comparadas como el número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos fertilizados y embriones transferidos fueron similares en ambos protocolos.

**Tabla 2.** Comparación fase folicular vs fase lútea de los desenlaces clínicos de forma global en las pacientes con DuoStim.

| Variable                           | Fase Folicular<br>n=149 | Fase Lútea<br>n= 149 | p      |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------|--------|
| Estimulación (días) <sup>a</sup>   | 10.1 ± 1.8              | 10.9 ± 2.1           | <0.001 |
| Dosis FSH <sup>a</sup>             | 3342.8 ± 912.6          | 3702.8 ± 968.3       | 0.003  |
| Dosis LH <sup>a</sup>              | 1499.3 ± 381.5          | 1664.9 ± 384.02      | 0.001  |
| Ovocitos obtenidos <sup>a</sup>    | 7.1 ± 4.6               | 7.2 ± 5.5            | 0.74   |
| Ovocitos MII <sup>a</sup>          | 5.5 ± 3.8               | 5.9 ± 4.8            | 0.77   |
| Ovocitos fertilizados <sup>a</sup> | 5.4 ± 3.7               | 5.6 ± 4.6            | 0.44   |
| Embriones transferidos             | 1.3 ± 0.5               | 1.5 ± 0.5            | 0.70   |

<sup>a</sup> Las variables cuantitativas fueron expresadas en medias y desviación estándar. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

Con el objetivo de realizar una comparación de los desenlaces en los distintos grupos de estudio se realizaron las tablas 3, 4 y 5.

La tabla 3, muestra la comparación únicamente para las pacientes que fueron sometidas a DuoStim sin PGT-A. En este grupo también, los días de estimulación fueron mayores en la fase lútea comparado con la fase folicular ( $10.2 \pm 1.8$  vs  $11.2 \pm 2.2$ ;  $p=0.062$ ). Las dosis empleadas de FSH y LH fueron mayores en fase lútea, sin diferencia estadísticamente significativa.  $3467.3 \pm 835.4$  vs  $3856.4 \pm 949.5$  ( $p=0.102$ ) de FSH utilizada, y dosis de LH utilizadas  $1553.2 \pm 324.1$  vs  $1718.9 \pm 436.1$ , ( $p=0.10$ ). Tampoco se observaron diferencias en cuanto al número de ovocitos obtenidos, ovocitos maduros, ovocitos fertilizados y a los embriones transferidos.

**Tabla 3.** Comparación de la fase folicular vs fase lútea en las pacientes sin PGT-A.

| Variabes                         | Fase folicular<br>n=62 | Fase lútea<br>n=62 | p    |
|----------------------------------|------------------------|--------------------|------|
| Estimulación (días) <sup>a</sup> | 10.2 ± 1.8             | 11.2 ± 2.2         | 0.06 |
| Dosis FSH <sup>a</sup>           | 3467.3 ± 835.4         | 3856.4 ± 949.5     | 0.10 |
| Dosis LH <sup>a</sup>            | 1553.2 ± 324.1         | 1718.9 ± 436.1     | 0.10 |
| Ovocitos obtenidos <sup>a</sup>  | 4.9 ± 3.4              | 4.9 ± 3.0          | 0.92 |
| Ovocitos MII <sup>a</sup>        | 3.4 ± 2.4              | 3.5 ± 2.5          | 0.51 |
| Ovocitos fertilizados            | 3.3 ± 2.4              | 3.5 ± 2.5          | 0.63 |
| Embriones transferidos           | 1.7 ± 0.6              | 2.0 ± 0.3          | 0.84 |

<sup>a</sup> Las variables cuantitativas fueron expresadas en medias y desviación estándar. Ovocitos MII: Ovocitos en metafase. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

En la tabla 4, se muestran las comparaciones para el grupo de PGT-A. Para este grupo, se observó un mayor número de días de estimulación en la fase lútea comparado con la fase folicular ( $9.8 \pm 1.5$  vs  $10.7 \pm 1.8$ ;  $p < 0.001$ ). En este grupo la dosis de FSH utilizada fue mayor en la fase folicular en comparación con la dosis de fase lútea ( $3779.6 \pm 842.1$  vs  $3559.9 \pm 946.5$ ;  $p = 0.048$ ). al igual que la dosis requerida de LH fue mayor en la fase lútea ( $1618.9 \pm 333.9$  vs  $1434.1 \pm 390.4$ ;  $p = 0.024$ ). Se obtuvieron mayor cantidad de ovocitos MII pero esta diferencia no fue significativa ( $7.7 \pm 5.3$  vs  $7.3 \pm 4.05$ ). En cuanto al número de ovocitos fertilizados y embriones transferidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 4.** Comparación de la fase folicular vs fase lútea en las pacientes que realizaron DuoStim con PGT-A.

| Variables                           | Fase folicular<br>n=87 | Fase lútea<br>n=87 | p      |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------|--------|
| Estimulación (días) <sup>a</sup>    | $9.8 \pm 1.5$          | $10.7 \pm 1.8$     | <0.001 |
| Dosis FSH <sup>a</sup>              | $3779.6 \pm 842.1$     | $3559.9 \pm 946.5$ | 0.04   |
| Dosis LH <sup>a</sup>               | $1434.1 \pm 390.4$     | $1618.9 \pm 333.9$ | 0.02   |
| Ovocitos obtenidos <sup>a</sup>     | $9.01 \pm 4.6$         | $9.1 \pm 6.2$      | 0.84   |
| Ovocitos MII <sup>a</sup>           | $7.3 \pm 4.05$         | $7.7 \pm 5.3$      | 0.51   |
| Ovocitos fertilizados <sup>a</sup>  | $6.8 \pm 3.8$          | $7.1 \pm 5.1$      | 0.69   |
| Embriones transferidos <sup>a</sup> | $1.0 \pm 0.2$          | $1.0 \pm 0.2$      | 1      |

<sup>a</sup> Las variables cuantitativas fueron expresadas en medias y desviación estándar. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

En el grupo de pacientes en las que únicamente se realizó preservación de la fertilidad, no se observaron diferencias en ninguna de las variables comparadas entre los protocolos de fase folicular y lútea.

**Tabla 5.** Comparación de la fase folicular vs fase lútea en grupo de pacientes de preservación de la fertilidad

| Variables                        | Fase folicular<br>n=6 | Fase lútea<br>n=6  | p    |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|------|
| Estimulación (días) <sup>a</sup> | $12.6 \pm 3.5$        | $12.0 \pm 3.6$     | 0.36 |
| Dosis FSH <sup>a</sup>           | $4450.0 \pm 1682.8$   | $4187.5 \pm 949.5$ | 0.77 |
| Dosis LH <sup>a</sup>            | $1400.2 \pm 525.3$    | $1718.9 \pm 471.1$ | 0.63 |
| Ovocitos obtenidos <sup>a</sup>  | $9.1 \pm 2.5$         | $9.5 \pm 2.4$      | 0.46 |
| Ovocitos MII <sup>a</sup>        | $8.5 \pm 2.3$         | $9.0 \pm 2.6$      | 0.51 |

<sup>a</sup> Las variables cuantitativas fueron expresadas en medias y desviación estándar. Ovocitos MII: Ovocitos en metafase. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significativo.

En la tabla 6, se detallan los resultados de los desenlaces clínicos en pacientes que realizaron DuoStim sin PGT-A. De un total de 62 pacientes se obtuvieron 46 embriones en fase folicular, de los cuales 25 embriones fueron transferidos, se obtuvieron 55 embriones en fase lútea de los cuales 27 embriones fueron transferidos, 10 pacientes aun no han sido transferidas. Respecto a la tasa de gestación en fase folicular 76.0% (19/25) vs 66.0%(18/27) en la fase lútea, sin diferencia estadísticamente significativa, la tasa de implantación fue similar en ambas fases 39.1% (18/46) vs 38.1% (21/55) sin diferencia significativa, en cuanto a la tasa de aborto 15.7% (3/19) vs 5.5% (1/18), y embarazo bioquímico 0%(/17) vs 0% (0/18), no hubo diferencias significativas, mientras que la tasa de recién nacido vivo fue mayor en estimulación en fase lútea de 59.2% (16/27) vs 40.0% (10/25) sin diferencia significativa, y por último la tasa de embarazo en curso fue de 18.7% (3/16) en fase folicular vs 4.7% (1/21) en fase lútea, sin diferencia estadísticamente significativa. En la figura 2, se muestran gráficamente estos resultados.

**Tabla 6.** Resultados reproductivos en pacientes que realizaron estimulación fase folicular y fase lútea sin PGT-A

| Tasa                       | Sin PGT-A<br>Fase folicular<br>n=62 | Sin PGT-A<br>Fase lútea<br>n=62 | p    |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|
| Tasa de gestación          | 76.0% (19/25)                       | 66.0 % (18/27)                  | 0.66 |
| Tasa de implantación       | 39.1 % (18/46)                      | 38.1 % (21/55)                  | 0.92 |
| Tasa de aborto             | 15.7 % (3/19)                       | 5.5 % (1/18)                    | 0.63 |
| Tasa embarazo bioquímico   | 0% (0 /19)                          | 0 % (0/18)                      | ---  |
| Tasa de recién nacido vivo | 40.0% (10/25)                       | 59.2 % (16/27)                  | 0.27 |

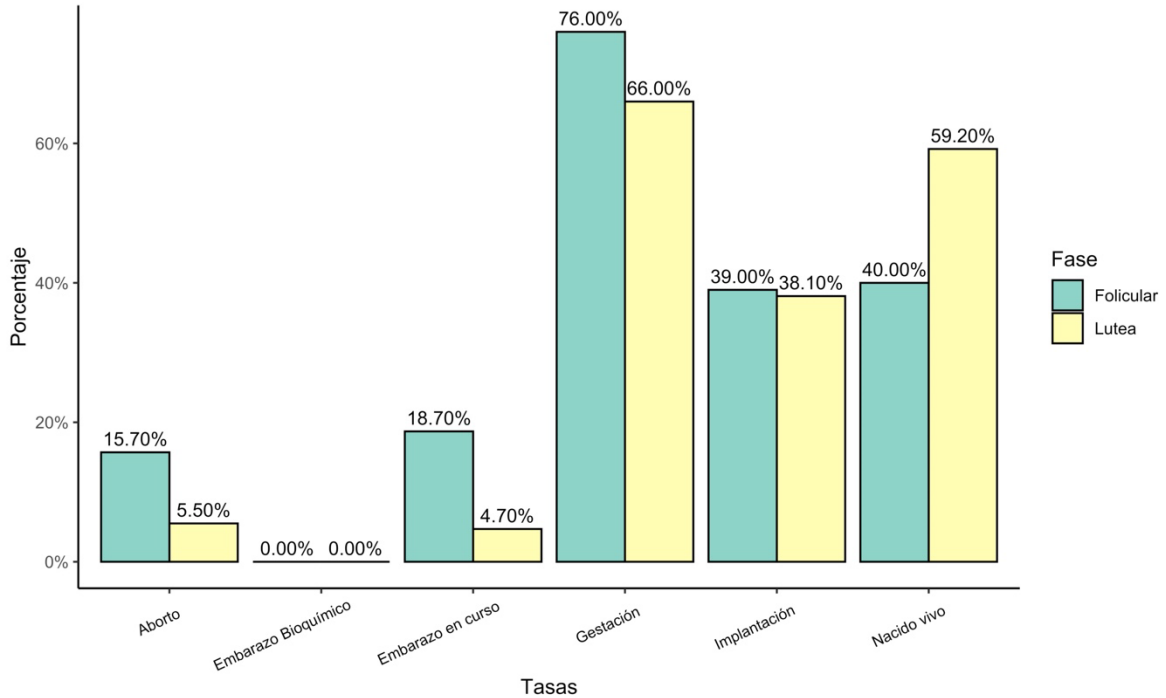


Gráfico 1: Resultados reproductivos en pacientes que realizaron DuoStim sin PGT-A.

En la tabla 7, se detallan los resultados de los desenlaces clínicos en pacientes que realizaron DuoStim con PGT-A. De un total de 87 pacientes que realizó DuoStim con PGT-A, se realizaron 25 transferencias de embriones obtenidos en fase folicular, 29 embriones transferidos obtenidos en fase lútea y 33 pacientes no se transfirieron. El número total de embriones euploides fue: 69 embriones en fase folicular vs 76 embriones en fase lútea. La tasa de gestación en fase folicular 68.0% (17/25) vs 72.0%(21/29) sin diferencia estadísticamente significativa, la tasa de implantación presentó un mayor número para la estimulación en fase lútea 68.7% (22/32) vs 59.2% (16/27) de la fase folicular, sin diferencia significativa, en lo referente a la tasa de aborto fue mayor, en la estimulación en fase lútea de 14.2% (3/21) vs 5.8% (1/17) sin diferencia estadísticamente significativa, se presentó un embarazo bioquímico en la fase folicular 5.8%(1/17) vs 0% (0/21) en la fase lútea, sin diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a tasa de recién nacido vivo fue similar en estimulación en fase lútea de 58.6% (17/29) vs 56.0% (14/25), de igual forma sin diferencia significativa, respecto a la tasa de embarazo en curso, cuenta con un embarazo en curso en cada fase 6.2%(1/16) vs 4.5%(1/22) sin diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las comparaciones. En la figura 1 se ilustran también estos resultados.



**Tabla 7. Resultados reproductivos en pacientes que realizaron estimulación fase folicular y fase lútea con PGT-A**

| Tasa                        | CON PGT-A<br>Fase folicular<br>n=87 | CON PGT-A<br>Fase lútea<br>n=87 | p    |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|
| Tasa de gestación           | 68.0% (17/25)                       | 72.0% (21/29)                   | 0.95 |
| Tasa de implantación        | 59.2 % (16/27)                      | 68.7 % (22/32)                  | 0.63 |
| Tasa de aborto              | 5.8 % (1/17)                        | 14.2 % (3/21)                   | 0.75 |
| Tasa de embarazo bioquímico | 5.8% (1/17)                         | 0 % (0/21)                      | 0.84 |
| Tasa de recién nacido vivo  | 56.0% (14/25)                       | 58.6 % (17/29)                  | 1.00 |

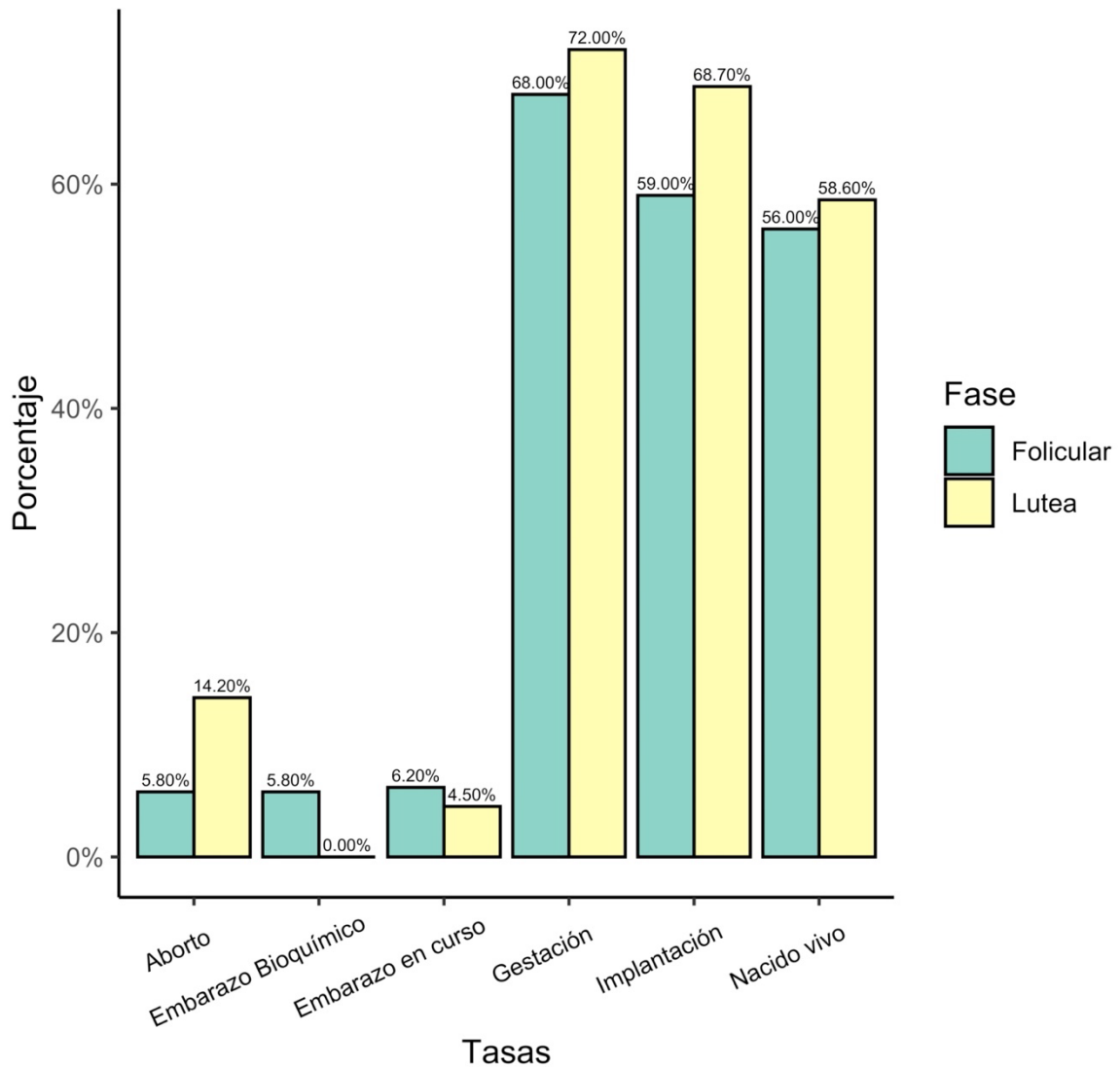


Gráfico 2: Resultados reproductivos de pacientes que realizaron DuoStim con PGT-A.

## DISCUSIÓN

Duostim tiene como objetivo aumentar significativamente el número de ovocitos recuperados durante un período de tiempo específico, en un solo ciclo menstrual. Nuestros resultados sugieren que la doble estimulación ó DuoStim pudiera ser una excelente herramienta que se puede implementar para obtener un mayor número de óvulos y embriones. Este prometedor protocolo podemos emplearlo en pacientes con indicación de baja reserva ovárica, edad materna avanzada con estudio genético preimplantatorio y en candidatas de preservación de la fertilidad por condición social u oncológica. En nuestros grupos de estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al comparar resultados de fase folicular vs fase lútea, obteniendo valores semejantes en la obtención de ovulos, ovocitos en metafase II y fertilización por lo cual consideramos que DuoStim tiene excelentes utilidades cuando la finalidad es obtener el mayor número de óvulos en el menor tiempo posible.

Nuestro estudio sugiere que la cantidad de gonadotropinas utilizadas y los días de duración de la estimulación ovárica fue mayor con diferencia estadísticamente significativa en la estimulación en fase lútea vs la estimulación en fase folicular, como lo demuestra Yanping Kuang y colaboradores en 2014<sup>16</sup>, quien realizó el protocolo Shanghai, donde encuentra que la estimulación en fase lútea se administro una mayor cantidad de gonadotropinas, al igual que Alberto Vaiarelli y colaboradores en 2018<sup>42</sup>, en el estudio donde se incluyeron a mujeres con baja reserva ovárica con criterios de Bologna, observando un aumento en los días de administración de gonadotropinas, al igual que una cantidad mayor de las mismas.

Con el objetivo de realizar una comparación en los desenlaces clínicos de cada grupo de pacientes se realizó un análisis en el grupo de DuoStim con PGT-A (87 pacientes). Los resultados respecto a tasa de gestación fue similar sin diferencia significativa, 68.0% (17/25) vs 72.0% (21/29) EFF vs EFL, respecto a nuestros resultados en tasa de recién nacido vivo obtuvimos similitud en ambas fases de estimulación sin diferencia significativa 56.0% (14/25) vs 58.6% (17/29). Existe literatura reportada con tasas muy similares a las reportadas en nuestro estudio, sin diferencias significativas en relación a tasa de gestación 57% (104/182) vs 62% (128/208) estimulación convencional vs estimulación fase lútea, también reportan una tasa de recién nacido vivo de 44% (80/182) vs 49% (102/207) sin observar diferencias significativas en ambas fases de la estimulación. El estudio de Alberto Vaiarelli y colaboradores en 2020<sup>33</sup>, donde se incluyeron a mujeres sometidas a DuoStim

con estudio genético preimplantacional y transferidas con embriones euploides; En nuestros resultados también encontramos similitud estadística lo cual da mayor validez a las aportaciones de nuestro estudio y refuerza nuestra hipótesis de que la doble estimulación es similar en cuanto a los resultados clínicos obtenidos en fase folicular vs fase lútea. Es importante mencionar que este grupo de pacientes realizó estudio genético preimplantacional debido a edad materna avanzada, lo cual demuestra la utilidad de DuoStim en este grupo de población, obteniendo resultados equiparables en relación a la euploidía embrionaria, en cuanto a número significativamente mayor de ovocitos obtenidos<sup>39</sup>, ovocitos MII<sup>40</sup>, mayor cantidad de blastocistos, y más embriones criopreservados<sup>41,42, 43</sup>.

En el grupo de DuoStim sin PGT-A se incluyeron 62 pacientes de las cuales se obtuvieron buenos resultados respecto a tasa de gestación 76.0% (19/25) vs 66.0% (18/72) referente a estimulación en fase folicular vs estimulación en fase lútea. Hablando de tasa de implantación y recién nacido vivo no se demostraron diferencias entre los dos tipos de estimulación 39.1% (18/46) vs 38.1 (21/55) y 40.0% (10/25) vs 59.2% (16/27) respectivamente, estos resultados son equiparables con algunos autores que comparan el uso de DuoStim en pacientes con baja reserva ovárica obteniendo resultados similares como lo demuestra Yanping Kuang y colaboradores en 2014<sup>16</sup>, al comparar un grupo de mujeres con baja reserva ovárica y al realizar protocolo de DuoStim informando resultados similares a los reportados en nuestro estudio. Ellos encontraron diferencias en la tasa de implantación de 47.6% (21/10) vs 35.7% (14/5) respectivamente. En relación a los días de estimulación, y a las dosis utilizadas de gonadotropinas en estimulación en fase folicular vs estimulación en fase lútea también obtuvimos resultados semejantes a los reportados en la literatura, como lo demuestra en su estudio Gustavo N Cecchino y colaboradores en 2021<sup>44</sup>. Mas no se presentó diferencia significativa en relación a número de ovocitos obtenidos, número de embriones metafase II, ni tampoco en embriones transferidos<sup>45,46</sup>.

Las pacientes con indicación de DuoStim con preservación de la fertilidad (6 pacientes) obtuvieron resultados sin diferencias significativas al comparar estimulación en fase folicular vs estimulación en fase lútea esto puede ser explicado debido a la cantidad de pacientes incluidas en este grupo. La preservación de la fertilidad es una necesidad en nuestra actualidad, ya sea por condiciones oncológicas o sociales, en el ámbito oncológico es crucial recurrir a técnicas de preservación de la fertilidad debido a que en las últimas décadas existe un incremento en la incidencia de cáncer en adolescentes y mujeres jóvenes

en edad reproductiva, por lo cual los tratamientos han mejorado sus tasas de éxito logrando mayor número de sobrevivientes a largo plazo, esto se verá reflejado en el deseo de obtener un resultado reproductivo favorable a futuro, por ello un grupo de expertos liderados por el Dr. Victor Alfonso Batiza Resendiz y colaboradores en 2020,<sup>45</sup> se dio a la tarea de realizar un comité de opinión donde se establecen las indicaciones específicas para poder ser candidatas a preservación de la fertilidad en base al diagnóstico oncológico y al estadio clínico, estandarizando indicaciones y protocolos a utilizar. Dentro de estas estrategias efectivas para preservación se encuentra protocolo DuoStim que tiene la ventaja de ser útil no solo para pacientes oncológicas, sino que además puede ser efectivo en mujeres que desean preservar su fertilidad por condición social y que además cursan con una baja reserva ovárica o una edad materna avanzada, duplicando la cantidad de ovocitos obtenidos para mejorar el futuro reproductivo, como lo demuestran Nikolaos Tsampras y colaboradores en 2017,<sup>18</sup> donde demuestra un promedio de días de estimulación en fase folicular de 9 a 14 días, y durante la estimulación en fase lútea un rango de 10 a 17 días de estimulación, siendo mayor pero sin diferencia significativa en la fase lútea, respecto a la recolección de ovocitos metafase II en fase folicular una media de 8.1, y en estimulación en fase lútea de 8,2 sin diferencias significativas<sup>16</sup>, resultados similares a los encontrados en nuestro estudio donde se reportan en base al número de días de estimulación  $12.6 \pm 3.5$  en fase folicular, vs  $12.0 \pm 3.6$  en fase lútea, y con respecto a la obtención de ovocitos y ovocitos maduros en fase folicular vs fase lútea  $9.1 \pm 2.5$  vs  $9.5 \pm 2.4$  y  $8.5 \pm 2.3$  vs  $9.0 \pm 2.6$  respectivamente. Sin diferencias en ninguna de las variables. El autor Alberto Vaiarelli y col 2020,<sup>47</sup> reporta resultados en cuanto al número de ovocitos obtenidos, ovocitos maduros, y ovocitos vitrificados similares a nuestros resultados, comprobando la utilidad de este protocolo en el entorno de preservación de la fertilidad.

En nuestros resultados acerca de las pacientes que se sometieron a DuoStim sin PGT-A no se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las tasas de gestación, tasa de implantación, tasa de recién nacido vivo, al igual que de embarazo en curso, al comparar estimulación en fase folicular vs estimulación en fase lútea, estos hallazgos confirman la viabilidad al realizar una doble estimulación en un mismo ciclo para pacientes con diagnóstico baja reserva ovárica, como lo demuestra Filippo María Ubaldiy colaboradores en 2016<sup>11, 36, 48</sup>. Encontrando resultados similares a los nuestros.

Las tasas de aborto y embarazo bioquímico no demostraron ninguna diferencia significativa entre pacientes estimuladas en fase folicular vs las estimuladas en fase lútea, en los

diferentes grupos analizados, siendo estos resultados importantes para demostrar que no existe ninguna inferioridad en los embriones obtenidos en estimulación en fase lútea con protocolo DuoStim.

DuoStim requiere se realice un análisis a profundidad sobre su costo-beneficio, días de estimulación, dosis de medicamentos y tipos de medicamentos administrados, debido a que algunos autores varían en relación al tipo de medicamentos utilizados para la realización de protocolo DuoStim, como lo describe Yanping Kuang y colaboradores en 2014.<sup>16</sup> En el protocolo Sanghai utilizando para su estimulación HMG, citrato de clomifeno y letrozol, sin embargo, la elección de los medicamentos en un protocolo DuoStim deberá basarse en su efectividad como lo demuestran algunos metanálisis que informan mayor recuperación ovocitaria y menor cantidad de días de estimulación con FSH-r en comparación de HMG<sup>49,50</sup>.

Diversos estudios han informado sobre un número mayor de ovocitos obtenidos después de estimulación en fase lútea,<sup>43</sup> dicho resultado podría estar influenciado por el enfoque de doble estimulación en un mismo ciclo menstrual, debido a que la EFL se realiza poco tiempo después de terminada la EFF y por consiguiente existe un alto nivel de estradiol y progesterona alcanzado inmediatamente después de finalizada EFF y esto puede sincronizar la cohorte de folículos antrales que crecerán durante la EFL, así como impulsar la proliferación de receptores de FSH en células de la granulosa<sup>51</sup>, esto dando resultados positivos en general en una mejor respuesta a la estimulación. Lo anterior puede tener relación en nuestros resultados debido a que todas nuestras pacientes incluídas recibieron preparación con estradiol en la fase lútea tardía del ciclo previo a la estimulación convencional, lo cual ha demostrado efectividad en cualquier tipo de paciente la cual sea sometida a FIV, sin embargo, en el grupo pacientes con baja reserva ovárica ya se ha implementado con excelentes resultados y han demostrado mejorar sus resultados reproductivos. Lo cual tiene relación al papel que juegan los andrógenos en la foliculogénesis, facilitando la expresión del receptor de la hormona FSH y actuando de manera sinérgica con el factor de crecimiento similar a la insulina, estimulando el crecimiento folicular<sup>52</sup>.

El protocolo DuoStim aun requiere un análisis costo beneficio, así como más estudios de cohorte aleatorizados sobre su seguridad biológica y neonatal, al igual se requiere un consenso sobre información contundente en base a los días de estimulación, dosis y tipos de medicamentos utilizados sobre la estimulación en fase lútea, esta elección de

medicamentos debe realizarse en el contexto de su efectividad, teniendo en cuenta que durante la fase lútea existen niveles elevados de estradiol y progesterona por el disparo de la ovulación y ello tener relación con el incremento en los días de estimulación ovárica en la fase lútea, una de nuestras teorías con respecto a esta interrogante en relación al incremento de días de estimulación puede guardar relación con un inicio temprano entre la captura ovocitaria de la fase folicular y el inicio temprano de la estimulación en fase lútea, sin embargo se requieren estudios para resolver esta interrogante.

Una de las fortalezas de este estudio es la alta tasa de implantación reportada en el grupo de pacientes sometidas a protocolo de estimulación DuoStim con PGT-A, donde se observan tasas de implantación de 59.2% (16/27) en estimulación en fase folicular vs 68.7%(22/32) reportados en estimulación en fase lútea, lo cual no solo nos demuestra la no inferioridad entre embriones obtenidos en fase folicular y fase lútea, sino que además nos demuestra como el protocolo de DuoStim potencializa las tasas de implantación al realizarlo junto con estudio genético preimplantacional, potencializando mejores resultados clínicos, esto en pacientes de edad materna avanzada.

Otra fortaleza de nuestro estudio estriba, en que hemos logrado comparar la similitud de resultados en diferentes grupos de pacientes con indicaciones diferentes tales como baja reserva ovárica, edad materna avanzada y pacientes candidatas a preservación de la fertilidad y en ninguno de estos grupos de pacientes se ha observado inferioridad en el número de ovocitos recuperados, ovocitos maduros, al comparar ambas fases de estimulación.

Por otra parte, una de nuestras debilidades es el número limitado de pacientes con el que contamos, pero que sin lugar a duda seguirán sumándose más pacientes en el transcurso de los años, lo cual puede abrir más líneas de investigación para futuros estudios.

## **CONCLUSIONES**

Las pacientes con baja reserva ovárica o con otras indicaciones diferentes como edad materna avanzada o preservación de la fertilidad, pueden ser favorecidas con protocolo de doble estimulación, obteniendo mayor número de óvulos en un mismo ciclo menstrual mejorando los resultados reproductivos y disminuyendo el tiempo para su obtención.

La comprobación de la existencia de múltiples ondas foliculares abre grandes oportunidades en comparación a otros protocolos para realizar fertilización in vitro y que pueden ser empleados en grupos de pacientes con mal pronóstico reproductivo, demostrando que DuoStim podría ser una alternativa prometedora para mejorar resultados clínicos.

La calidad de los ovocitos obtenidos en EFL no es inferior a la de los que son obtenidos por medio de EFF, en base a lo obtenido como resultados reproductivos y asociado a euploidía.

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Cimadomo D, et al. Luteal phase anovulatory follicles result in the production of competent oocytes: intra-patient paired case-control study comparing follicular versus luteal phase stimulations in the same ovarian cycle. *Human Reprod* 2018;33(8):1442-1448.
- <sup>2</sup> Ferraretti AP, et al. 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.
- <sup>3</sup> Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978 Aug 12;2(8085):366.
- <sup>4</sup> Eskew AM, Jungheim ES. A History of Developments to Improve *in vitro* Fertilization. *Mo Med*. 2017 May-Jun;114(3):156-159.
- <sup>5</sup> Angela R, et al. Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in women, *Biol Reprod*. 2003;69(3):1023–1031.
- <sup>6</sup> Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* 2012;78:1733–48.
- <sup>7</sup> Ubaldi FM, et al. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment. *Front Endocrinol* 2019;10:94. doi: 10.3389/fendo.2019.00094.
- <sup>8</sup> 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.
- <sup>9</sup> Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989;87:223–30.
- <sup>10</sup> Bentov Y, et al. An ongoing pregnancy from two waves of follicles developing during a long follicular phase of the same cycle. *Fertil Steril* 2010;94:350.



---

<sup>11</sup> Sighinolfi G, Sunkara SK, La Marca A. New strategies of ovarian stimulation based on the concept of ovarian follicular waves: From conventional to random and double stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(4):489-497.

<sup>12</sup> Vaiarelli A, et al. Reply: 'Second stimulation in the same ovarian cycle', probably a terminology more appropriate than 'luteal phase stimulation' in the DuoStim protocol, *Human Reprod* 2021;36(6):1723–1724.

<sup>13</sup> 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.

<sup>14</sup> Laura Rienzi, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance, *Human Reprod* 2017;23(2):139–155.

<sup>15</sup> Nagy ZP, et al. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):10.

<sup>16</sup> Kuang Y, Chen Q, Hong Q, Lyu Q, Ai A, Fu Y, Shoham Z. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reprod Biomed Online*. 2014.

<sup>17</sup> Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Colamaria S, Alviggi C, Trabucco E, Venturella R, Vajta G, Rienzi L. 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 Jun.

<sup>18</sup> 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.

- 
- <sup>19</sup> Wald K, Cakmak H, Mok-Lin E, Cedars M, Rosen M, Letourneau J. Back-to-back random-start ovarian stimulation prior to chemotherapy to maximize oocyte yield. *J Assist Reprod Genet.* 2019 Jun;36(6):1161-1168. doi: 10.1007/s10815-019-01462-5. Epub 2019 May 24.
- <sup>20</sup> Polyzos N.P. Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril.* 2011;96:1058-1061.
- <sup>21</sup> Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L., 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.* 26, 1616–1624
- <sup>22</sup> Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, 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.
- <sup>23</sup> Lean SC, Derricott H, Jones RL, Heazell AEP. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017 Oct 17;12(10):e0186287.
- <sup>24</sup> Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril.* 2014 Mar;101.
- <sup>25</sup> Patrizio P, Vaiarelli A, Levi Setti PE, Tobler KJ, Shoham G, Leong M, et al. How to define, diagnose and treat poor responders? Responses from a worldwide survey of IVF clinics. *Reprod Biomed Online.* 2015.
- <sup>26</sup> Gica C, Maxim BG, Botezatu R, Peltecu G, Panaitescu AM, Iordachescu D, Gica N. Double Ovarian Stimulation in the Same Ovarian Cycle. *Maedica (Bucur).* 2021 Mar;16(1):102-106.

---

<sup>27</sup> Bosch E, Bulletti C, Copperman AB, Fanchin R, Yarali H, Petta CA, et al. How time to healthy singleton delivery could affect decision-making during infertility treatment: a Delphi consensus. *Reprod Biomed Online*. 2019;38:118–30.

<sup>28</sup> Ubaldi F, Vaiarelli A, D'Anna R, Rienzi L. Management of poor responders in IVF: is there anything new? *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–10.

<sup>29</sup> Vaiarelli A, Cimadomo D, Conforti A, Schimberni M, Giuliani M, D'Alessandro P, Colamaria S, Alviggi C, Rienzi L, Ubaldi FM. Luteal phase after conventional stimulation in the same ovarian cycle might improve the management of poor responder patients fulfilling the Bologna criteria: a case series. *Fertil Steril*. 2020;113:121–30.

<sup>30</sup> Brandes M., J.O.M. van der Steen, S.B. Bokdam, C.J.C.M. Hamilton, J.P. de Bruin, W.L.D.M. Nelen, J.A.M. Kremer, 24, Issue 12, December 2009, Pages 3127–3135.

<sup>31</sup> Wang Ningling, Wang Yun, Chen Qiuju, Dong Jing, Tian Hui, Fu Yonglun, Ai Ai, Lyu Qifeng, Kuang Yanping. Luteal-phase ovarian stimulation vs conventional ovarian stimulation in patients with normal ovarian reserve treated for IVF: a large retrospective cohort study. *Clinical Endocrinology*. 2015;84(5):720–728. doi: 10.1111/cen.12983.

<sup>32</sup> Liu C, Jiang H, Zhang W, et al. Double ovarian stimulation during the follicular and luteal phase in women 38 years: a retrospective case-control study. *Reprod Biomed Online*. 2017;35(6):678–684.

<sup>33</sup> Vaiarelli A, Cimadomo D, Alviggi E, et al.. The euploid blastocysts obtained after luteal phase stimulation show the same clinical, obstetric and perinatal outcomes as follicular phase stimulation-derived ones: a multicenter study. *Hum Reprod* 2020; 35: 2598–2608.

<sup>34</sup> Martínez-Robles IM, González-Ortega C, Saavedra-Campos P, Chavarría-Noriega 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 oct;84(10):630-638.

- 
- <sup>35</sup> 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; pp 46: 381-393.
- <sup>36</sup> Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul 4;340(8810):17-8.
- <sup>37</sup> Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007 Jan 1;67(1):73-80.
- <sup>38</sup> Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, Simpson JL, van der Poel S. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017 Sep;108(3):393-406.
- <sup>39</sup> Jin B, Niu Z, Xu B, Chen Q, Zhang A, *Gynecol Endocrinol*. 2018 Aug. Comparison of clinical outcomes among dual ovarian stimulation, mild stimulation and luteal phase stimulation protocols in women with poor ovarian response.
- <sup>40</sup> Liu C, Jiang H, Zhang W, Yin H. Double ovarian stimulation during the follicular and luteal phase in women  $\geq 38$  years: a retrospective case-control study. *Reprod Biomed Online*. 2017 Dec; 35(6):678-684.
- <sup>41</sup> Cardoso MCA, Evangelista A, Sartório C, Vaz G, Werneck CLV, Guimarães FM, Sá PG, Erthal MC JBRA. Can ovarian double-stimulation in the same menstrual cycle improve IVF outcomes? *Assist Reprod*. 2017 Sep 1; 21(3):217-221.
- <sup>42</sup> Vaiarelli A, Cimadomo D, Trabucco E, et al. Double stimulation in the same ovarian cycle (DuoStim) to maximize the number of oocytes retrieved from poor prognosis patients: a multicenter experience and SWOT analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:317
- <sup>43</sup> Luo Y, Sun L, Dong M, Zhang X, Huang L, Zhu X, Nong Y, Liu F. The best execution of the DuoStim strategy (double stimulation in the follicular and luteal phase of the same ovarian cycle) in patients who are poor ovarian responders. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020 Oct 15;18(1):102.

- 
- <sup>44</sup> Cecchino GN, Roque M, Cerrillo M, Filho RDR, Chiamba FDS, Hatty JH, García-Velasco JA. DuoStim cycles potentially boost reproductive outcomes in poor prognosis patients. *Gynecol Endocrinol*. 2021 Jun;37(6):519-522.
- <sup>45</sup> Glujovsky D, Pesce R, Miguens M, Sueldo CE, Lattes K, Ciapponi A. How effective are the non-conventional ovarian stimulation protocols in ART? A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Dec;37(12):2913-2928.
- <sup>46</sup> Llácer, J., Moliner, B., Luque, L. *et al*. Estimulación de la fase lútea versus estimulación de la fase folicular en pacientes que responden mal a los ovarios: resultados de un ensayo controlado aleatorio. *Reprod Biol Endocrinol* 18, 9 (2020).
- <sup>47</sup> Vaiarelli A, Cimadomo D, Petriglia C, Conforti A, Alviggi C, Ubaldi N, Ledda S, Ferrero S, Rienzi L, Ubaldi FM. DuoStim - a reproducible strategy to obtain more oocytes and competent embryos in a short time-frame aimed at fertility preservation and IVF purposes. A systematic review. *Ups J Med Sci*. 2020 May;125(2):121-130.
- <sup>48</sup> Rashtian J, Zhang J. Luteal-phase ovarian stimulation increases the number of mature oocytes in older women with severe diminished ovarian reserve. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;64:216–9.
- <sup>49</sup> Santi D, Casarini L, Alviggi C, Simoni M. Efficacy of follicle-stimulating hormone (FSH) alone, FSH + luteinizing hormone, human menopausal gonadotropin or FSH + human chorionic gonadotropin on assisted reproductive technology outcomes in the “Personalized; Medicine Era: A Meta-analysis”. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:114.
- <sup>50</sup> Shavit T, Shalom-Paz E, Samara N, Aslih N, Michaeli M, Ellenbogen A. Comparison between stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF with GnRH antagonist protocol. *Gynecol Endocrinol*. 2016;32:629–33.
- <sup>51</sup> Fanchin R, Cunha – Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen – Bacri P, Frydman R. Coordination provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimen. *Fertil Steril* 2003a;79:316-321.

---

<sup>52</sup> M.E. Nielsen, I.A. Rasmussen, S.G. Kristensen, S.T. Christensen, K. Møllgård, E. Wreford Andersen, A.G. Byskov, C. Yding Andersen, In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA, *Molecular Human Reproduction*, Volume 17, Issue 1, January 2011.