

Revista Internacional de Andrología

www.elsevier.es/andrologia



ORIGINAL

Evaluación de un compuesto de antioxidantes sobre los parámetros seminales de concentración, movilidad y morfología espermática en pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática

Jesús Mateos Blanco* y Juan Alonso Cabo González

Servicio de Urología, Hospital Infanta Cristina, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

Recibido el 5 de julio de 2011; aceptado el 25 de julio de 2011-08-31

PALABRAS CLAVE

Espermatozoides;
Infertilidad;
Antioxidantes;
Técnicas de
reproducción asistida

Resumen

Introducción: Actualmente, el factor masculino es el responsable de forma aislada del 40% de los casos de infertilidad de pareja, compartiendo este protagonismo de forma adicional en un 20% junto al factor femenino, por lo que de forma conjunta, representa el 50% de todos los casos. A pesar de la falta de evidencia científica, el tratamiento empírico se ha utilizado ampliamente y continúa haciéndose en la actualidad, básicamente a expensa de compuesto de vitaminas y otros oligoelementos, que debido a su poder antioxidante, permitiría mejorar parámetros seminales como movilidad o morfología.

Objetivos: Estudiar los cambios en parámetros seminales en un grupo de pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática, a quienes se les pautó tratamiento con el complejo antioxidante.

Material y métodos: 40 pacientes con oligoastenoteratozoospermia idiopática fueron tratados con el complejo antioxidante Androferti® (Laboratorio Q-Pharma).

Conclusiones: El estudio demostró mejoría de los parámetros seminales concentración, movilidad progresiva y morfología a los 3 y 6 meses de tratamiento, presentando significación estadística el análisis de los datos, lo cual, dada la mejoría sobre el recuento de espermatozoides móviles (REM), permite a estos pacientes acudir a técnicas de reproducción asistida (TRA) como fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con mayor garantía, o incluso, parejas que debido al REM inicial necesariamente tenían que recurrir a dicha técnica de reproducción, pueden finalmente recurrir a inseminación artificial (IAC) ante la mejoría experimentada.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia

Correo electrónico: jemablanjaro@hotmail.com

KEYWORDS

Sperms;
Infertility;
Antirust;
Technologies of
assisted reproduction

Evaluation of a antioxidant compound on seminal parameters of sperm concentration, mobility and morphology in patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia

Abstract

Introduction: Nowadays, the masculine factor is the person in charge of form isolated of 40 % of the cases of infertility of pair, sharing this protagonism of additional form in 20 % close to the feminine factor, for what of joint form, it represents 50 % of all the cases. In spite of the lack of scientific evidence, the empirical treatment has been in use widely and continues being done at present, basically to expense of compound of vitamins and other trace elements, which due to his antirust power, it would allow to improve seminal parameters as mobility or morphology.

Objective: To study the changes in seminal parameters in a group of patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia, to whom they treatment was ruled by the antirust complex.

Material and methods: 40 patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia were treated by the complex antirust Androferti (Laboratory Q-Pharma).

Conclusions: The study demonstrated improvement of the seminal parameters concentration, progressive mobility and morphology to 3 and 6 months of treatment, presenting statistical significance the analysis of the information, which, given the improvement on the inventory of mobile sperms (REM), allows to these patients to come to technologies of assisted reproduction (TRA) as in vitro fertilization (FIV) or injection intracitoplasmática of sperms (ICSI) with major guarantee, or even, pairs who due to the initial REM necessarily had to resort to the above mentioned technology of reproduction, they can resort finally to artificial insemination (IAC) before the experienced improvement.

© 2011 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Se define la esterilidad como la incapacidad de una pareja sexualmente activa y sin medidas anticonceptivas para conseguir gestación en un año. A diferencia de la infertilidad, en la esterilidad la pareja no consigue la gestación en ningún momento, mientras que en aquella se logra la gestación pero acontece un aborto; a pesar de esta diferencia, ambos términos se utilizan con frecuencia como sinónimos en la literatura¹⁻³. El 13-18% de las parejas en edad reproductiva llegan a presentar algún problema de fertilidad⁴.

Aproximadamente 16.000 parejas acuden cada año a centros de reproducción humana asistida. En un 20% la infertilidad se debe a un factor masculino exclusivo, y en un 30-40% de los casos lo es por factores de ambos sexos, por lo que el factor masculino está presente en la mitad de las parejas infértiles^{1,5}.

La compleja maduración de la célula germinal masculina se produce a una temperatura de 32-35° C y tiene una duración de aproximadamente 74 días, completándose la maduración funcional con el paso del espermatozoide a lo largo del epidídimo, conductos deferentes y eyaculadores, durante un tiempo de 14 días más, y finaliza en el interior del aparato reproductor femenino, consiguiendo la capacidad de fecundar al óvulo cuando se encuentra con él^{6,7}.

La oligozoospermia se define como la concentración espermática menor de 15 millones/ml, y su presentación de

forma aislada es poco frecuente. La astenospermia o defecto en el movimiento de los espermatozoides se define cuando la movilidad progresiva A+B la presentan menos del 32% de los espermatozoides y, finalmente, la morfología espermática se considera normal cuando es mayor o igual al 4%, según los valores publicados para estos parámetros seminales en el manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el examen del semen humano y de la interacción del semen y del moco cervical, en su 5ª edición⁸. Estos defectos presentados de forma combinada, a menudo son consecuencia de varicoceles o idiopáticos; esta última causa representa el 25% de los pacientes, en quienes con un análisis de semen anormal no se pueden identificar las causas⁹.

El tratamiento médico empírico se ha recomendado para la oligoasthenoteratozoospermia idiopática, pero salvo alguna excepción, no ha resultado eficaz. En un metaanálisis de estudios controlados sobre esterilidad masculina idiopática no se comprobó que los tratamientos disponibles fueran eficaces¹⁰, aunque en informes de casos aislados y series pequeñas de pacientes, se ha demostrado que algunos de estos tratamientos sí lo son¹¹.

Uno de los tratamientos empíricos utilizados son los compuestos a base de vitaminas (A, E, C), oligoelementos, suplementos nutricionales (L-carnitina) y agentes antiinflamatorios (diclofenaco), basados en la actividad antioxidante, ya que las especies reactivas de oxígeno se asocian a causas de esterilidad masculina, así como de desnatura-

lización de la cromatina de los espermatozoides^{12,13}. Sin embargo, no se ha podido demostrar en estudios controlados que sean eficaces, al desconocer en qué grado estos agentes se concentran en el aparato reproductor masculino. Igualmente, la L-carnitina, molécula que participa en el metabolismo de las mitocondrias al intervenir en el transporte de grupos acetilo y acilo a través de la membrana mitocondrial interna, generándose la energía necesaria para mejorar la producción y la movilidad de los espermatozoides, y a pesar de que estudios *in vitro* han demostrado que la adición de L-carnitina y de acetil L carnitina al semen mejora la movilidad de los espermatozoides¹⁴, tampoco ha demostrado relación directa entre las concentraciones seminales y la fertilidad, ni que la carnitina administrada por vía oral aumentara las concentraciones en el epidídimo¹⁵.

Material y métodos

El estudio se ha realizado sobre 40 varones con oligoastenoteratozoospermia idiopática, que acudieron al Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (CERHA) para un tratamiento de fertilidad. A todos, tras la anamnesis y la exploración física, se les solicitó un estudio hormonal, cariotipo y microdeleciones del cromosoma Y, pruebas que fueron rigurosamente normales; ninguno de ellos presentó varicocele clínico, ni presentaron uro o seminocultivos positivos. A todos los pacientes se les pautó un tratamiento con Androferti®, 1 comprimido cada 12 horas, cuya composición es: L-carnitina 750 mg, coenzima Q10 10 mg, zinc 5 mg, ácido fólico 100 µg, selenio 25 µg, vitamina B12 0,5 µg, vitamina C 30 mg y vitamina E 5 mg. Se realizaron en todos los pacientes 2 seminogramas de control, a los 3 y 6 meses de comenzar el tratamiento. El estudio fue aprobado por el Comité de ética e investigación clínica de nuestro Hospital.

Se estudiaron los parámetros seminales de concentración, movilidad progresiva (A+B) y morfología, según los nuevos valores publicados en el último manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción del semen y del moco cervical, en su 5ª edición⁸.

El análisis y tratamiento de los datos para evaluar si existieron diferencias significativas a lo largo del tratamiento fue realizado mediante software - R, licencia GNU.

Resultados

Resultados del análisis descriptivo

El siguiente análisis muestra el comportamiento de los datos para cada variable analizada (concentración, movilidad progresiva A+B, morfología, capacitación espermática) y en los periodos de tiempo analizado (antes de iniciar el tratamiento con Androferti®, a los 3 y a los 6 meses).

Concentración

El análisis descriptivo (figs. 1 y 2) muestra que el intervalo de confianza (IC) se encuentra entre 10,8 y 69,0 a los 0 meses, mientras que los valores a los 6 meses se encuentran entre 15,25 y 84,0, con lo que se aprecia una mejoría entre los 0 y los 6 meses, llegando a ser significativa (en el test estadístico utilizado posteriormente).

Porcentaje de movilidad tipo A

Los valores centrales y de dispersión se representan por la media, ya que los datos se ajustan a una distribución de probabilidad de tipo normal según el test de Anderson-Darling. Por lo tanto, el IC (25,49 ± 16,58) antes de empezar el tratamiento muestra una gran dispersión de los datos, con un 65% de desviación estándar relativa (RSD), reduciéndose a un 54% tras los 6 meses de tratamiento, así mismo se observa un incremento en el valor medio de un 23% (25,49 a 31,35) (figs. 3 y 4).

Porcentaje de movilidad progresiva (tipo A+B)

En este análisis, con la variable movilidad (tipo A+B) se observa que con la toma de Androferti® durante 6 meses, la dispersión se reduce de un 56 a un 45%, y la media aumenta de 32,7 a 42,47.

El IC es 32,7 ± 18,3 a los 0 meses, es decir, los datos se encuentran entre el rango 14,4 y 51, apreciándose una me-

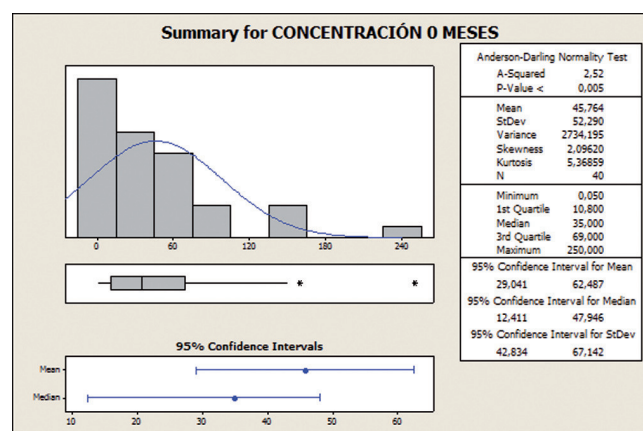


Figura 1 Concentración espermática a 0 meses.

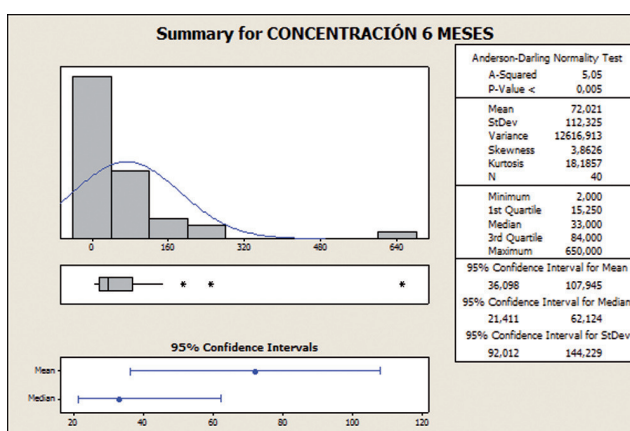


Figura 2 Concentración espermática a 6 meses.

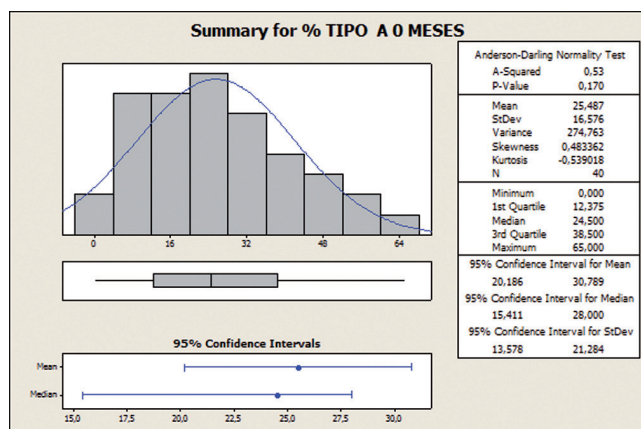


Figura 3 Porcentaje de movilidad tipo A a 0 meses.

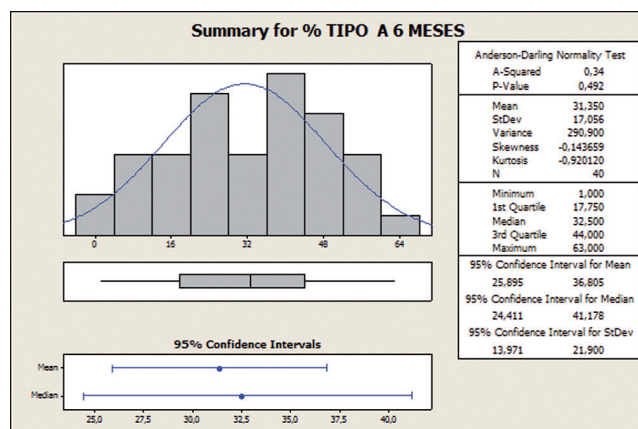


Figura 4 Porcentaje de movilidad tipo A a 6 meses.

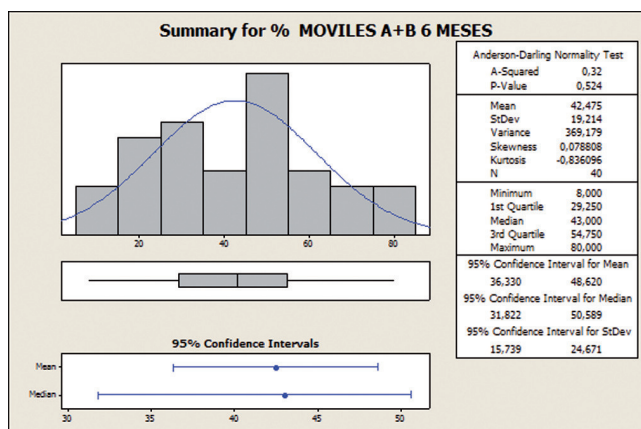


Figura 6 Porcentaje de movilidad progresiva (tipo A+B) a 6 meses.

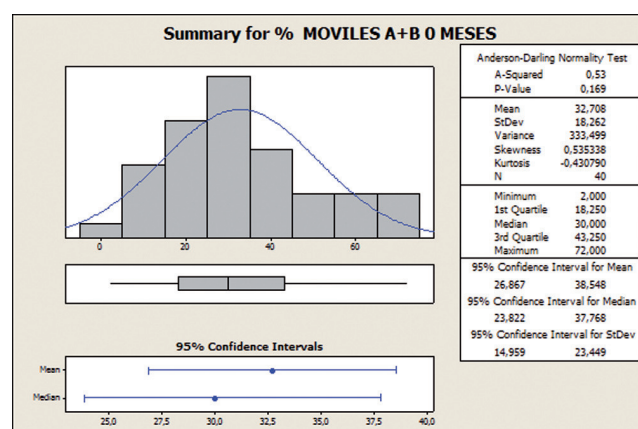


Figura 5 Porcentaje de movilidad progresiva (tipo A+B) a 0 meses.

oría a los seis meses de tratamiento (IC $42,5 \pm 19,2$) (figs. 5 y 6).

Porcentaje de formas normales

Como los datos se ajustan a una distribución de probabilidad de tipo normal, utilizamos como medida de centralización la media. En este análisis con la variable formas normales, apreciamos que con la toma de Androferti® durante 6 meses, la dispersión se reduce de un 72,6 a un 60,8%, y la media aumenta de 7,38 a 10,54 (figs. 7 y 8).

Resultados de la evaluación de las diferencias significativas entre tratamientos

Para la evaluación de las diferencias significativas se ha utilizado el test de Friedman. Este test, aunque es no paramétrico, se ha utilizado por la robustez de su cálculo ante valores muy dispersos, tal y como se ha presentado en el análisis descriptivo. Todos los resultados obtenidos muestran que la hipótesis nula del test de Friedman, es decir μ_0

$= \mu_3$ meses $= \mu_6$ meses, no se cumple (p-valor inferior a 0,05), por lo que se observa que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en el intervalo de tiempo del tratamiento, tal y como muestran los datos de los valores centrales (tabla 1), hallando diferencias significativas en todos los casos.

Discusión

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son radicales libres derivados del metabolismo del oxígeno, lo cual sucede a nivel celular. Pequeñas cantidades de ellos, en el aparato genital masculino, intervienen en funciones del espermatozoide¹⁶. Sin embargo, cantidades excesivas de los mismos, en relación a la capacidad antioxidante, son responsables del estrés oxidativo, y ello conlleva daños por dos mecanismos diferentes: fragmentación del ADN, al romper las cadenas únicas y dobles, y daño en la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática del es-

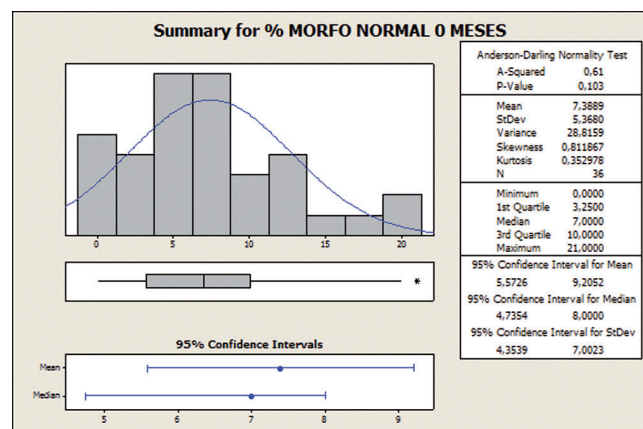


Figura 7 Porcentaje de formas normales a 0 meses.

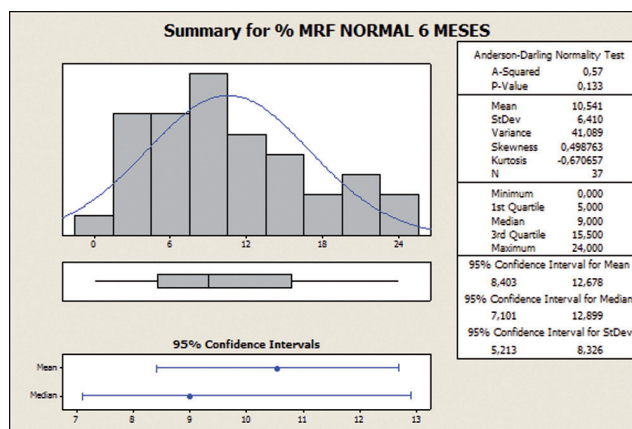


Figura 8 Porcentaje de formas normales a 6 meses.

Tabla 1 Resultados de la evaluación de las diferencias significativas entre tratamientos

	0 meses	3 meses	6 meses	Incremento	¿Significativo el incremento?	Valor OMS 5ª ed
Concentración (millones/ml)	45,76	49,98	72,02	26,26 (0 a 6 meses)	Sí, incremento del valor y test de Friedman 0 a 6 meses	15
% Movilidad (tipo A)	25,49	29,9	31,35	5,86	Sí, test de Friedman	No contemplado
% Movilidad progresiva (A+B)	32,71	40,63	42,48	9,77	Sí, test de Friedman	32
% Formas normales	7,39	10,19	10,54	3,15	Sí, test de Friedman	4
Capacitación espermática REM (millones)	3,1	4,8	5,6	2,5	Sí, test de Friedman	5

permatozoide, alterando con ello la movilidad espermática¹⁷.

Los antioxidantes inactivan de forma constante a las ROS, y en nuestro organismo ello se consigue de 3 formas: a través de los antioxidantes endógenos (coenzima Q-10, ácido úrico), antioxidantes de la dieta (vitaminas C y E, carotinoides, flavonoides) y proteínas fijadoras de metales (albúmina, transferrina, ferritina, etc.)¹⁶.

Entre los diagnósticos que ocasionan mayor estrés oxidativo podemos citar al varicocele, enfermedades sistémicas (diabetes mellitus, cáncer, problemas cardiovasculares) y las infecciones del aparato reproductor masculino, así como otros factores tales como el consumo de alcohol y tabaco, la exposición a altas temperaturas y la contaminación ambiental¹⁸⁻²².

Los antioxidantes de la dieta se encuentran presentes en frutas y verduras. Sin embargo, una dieta rica en ellas, no ha demostrado en el estudio de Silver et al.²³ relación entre la ingesta de antioxidantes de la dieta y el grado de fragmentación del ADN espermático, si bien sí se ha observado una relación positiva con la mejoría de los parámetros seminales²⁴.

La vitamina C se encuentra en concentraciones elevadas en el plasma seminal, es detectable incluso en los espermatozoides y elimina radicales de hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno. En un estudio de Dawson et al.²⁵ realizado en 75 fumadores fértiles, los 2 grupos que recibieron suplemento con vitamina C presentaron una mejoría significativa de los parámetros seminales de concentración, vitalidad y morfología, aunque en el estudio controlado y randomizado de Rolf et al.²⁶, no se demostró ningún efecto.

La vitamina E, que ejerce un efecto protector de la membrana espermática, en el estudio de Suleiman et al.²⁷ mejoró la movilidad de los espermatozoides, aunque en otro estudio como el realizado por Rolf et al.²⁶ doble ciego, controlado y randomizado, no se obtuvo esta mejoría, por lo que los resultados son contradictorios al evaluar la mejoría de los parámetros seminales.

La coenzima Q-10, se encuentra en las mitocondrias de la pieza media del espermatozoide. Baleria et al.²⁸ han mostrado en su estudio sobre 22 varones con oligozoospermia idiopática una mejoría significativa de la movilidad, en comparación a los resultados previos al tratamiento.

La carnitina elimina al acetyl CoA extracelular tóxico res-

ponsable de las ROS mitocondriales, y se encuentra en altas concentraciones en epidídimo. Aunque existen estudios no controlados como el de Costa et al.²⁹ donde se obtuvo una mejoría de la movilidad espermática, los estudios controlados y randomizados no han mostrado un aumento concluyente de la movilidad o del número de espermatozoides^{30,31}.

En nuestro estudio, tras el análisis estadístico de los parámetros de concentración, movilidad progresiva (A+B) y morfología, se halló un incremento significativo en el seminograma realizado a los 6 meses respecto del seminograma inicial y del realizado a los 3 meses desde el inicio del tratamiento. Igualmente, el REM mejoró a los 3 y 6 meses, alcanzando los mayores valores al final del tratamiento.

Por ello, la utilización de compuestos antioxidantes a base de vitaminas y oligoelementos, al mejorar los parámetros citados en nuestro estudio, permite mejorar el REM, lo cual puede ser determinante a la hora de indicar la técnica de reproducción asistida que pueda beneficiar más a la pareja.

Conclusiones

La utilización del compuesto Androferti® ha conseguido la mejoría de los parámetros seminales considerados de forma significativa tras el estudio realizado, careciendo de efectos adversos. La mejoría hallada en el REM a los 6 meses de tratamiento en el estudio estadístico permite concluir que es útil para mantener o mejorar las opciones de la pareja al tratamiento mediante técnicas de reproducción asistida. Dada la variabilidad de los análisis de semen y el desarrollo de embarazos en algunas parejas más allá del tratamiento, es necesario realizar estudios controlados con placebo, aleatorizados, doble ciego y cruzados para determinar la eficacia terapéutica de los tratamientos médicos empíricos, donde el resultado a considerar debería ser la tasa de embarazos; hasta entonces, la indicación de los antioxidantes debe considerarse puramente empírica; si bien, futuros estudios permitirán conocer si su utilización mejorará otros parámetros en técnicas de reproducción asistida como la calidad del embrión o los fallos de implantación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición, frecuencia y etiología. En: Vanrell JA, editor. Fertilidad y esterilidad humana. Barcelona: Masson; 1999. p. 1-7.
2. Chia SE, Ong CN, Chua LH. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl*. 2000;21:53-7.
3. Jensen TK, Vierula M, Hjøllund NH. Semen quality among Danish and Finnish men attempting to conceive. The Danish first pregnancy planner study team. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:47-52.
4. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H. The choice and outcome of the fertility treatment of 38 couples in whom the male partner has Yq microdeletion. *Hum Reprod*. 2005;20:1887-96.
5. Dadze S, Wieland C, Jakubiczka S. The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasian sample of German origin. *Mol Hum Reprod*. 2000;6:207-14.
6. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod*. 2003;18:1660-5.
7. Kamal A, Fahmy R, Mansour RT, Abou-Setta AM. Selection of individual testicular tubules from biopsied testicular tissue with a stereomicroscope improves sperm retrieval rate. *J Androl*. 2004;25:123-7.
8. Organización Mundial de la Salud. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 5th ed. Cambridge: University Press; 2010.
9. Sigman M, Jarow J. Esterilidad masculina. En: Wein A, Kavoussi L, Novick A, Partin A, Peters G, editores. Campbell-Walsh Urología. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 609-53.
10. O'Donovan PA, Vandekerckhove P, Lilford RJ. Treatment of male infertility: is it effective review and meta-analyses of published randomized controlled trials. *Hum Reprod*. 1993;8:1209-22.
11. Kumar R, Gautam G, Gupta P. Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J Urol*. 2006;176:1307-12.
12. Álvarez JG. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl*. 2007;5:354-63.
13. Balmori Boticario C, Areces Viña C, Pacheco Castro A, San Celes-tino Carhenilla M, García Velasco JA. Impacto de un complejo de antioxidantes sobre la fragmentación del ADN espermático en varones infértiles. *Rev Int Androl*. 2010;8:107-13.
14. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl L-carnitine in postgonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 1996;2:87-102.
15. Soufir JC, Ducot B, Marson J. Levels of seminal free L (-) carnitine in fertile and infertile men. *Int J Androl*. 1984;7:188-97.
16. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2004;8:616-27.
17. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J. Increased oxidative deoxy-ribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 1997;68:519-24.
18. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril*. 2003;79:287-91.
19. Cross C, Halliwell B, Borish E. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987;107:526-45.
20. Baños Hernández I, Valdés Carrillo R, Castillo García I. Alteraciones en la fertilidad masculina por exposición a pesticidas. *Rev Int Androl*. 2009;7:98-105.
21. Migueles Pastor B, Dorado Silva M, Hebles Duvison M, González Martínez M, Aguilera Duvison L, Lara Gallego JA, et al. ¿Es la temperatura ambiente un factor condicionante del resultado en ciclos de inyección intracitoplásmica de espermatozoides? *Rev Int Androl*. 2010;8:69-73.
22. López Teijón M, Barceló D, Farré M, Martínez E, Temprano H, Álvarez JG. Relación entre la exposición a disruptores endocrinos durante el período fetal y perinatal y la tasa de oligospermia. *Rev Int Androl*. 2011;9:41-9.
23. Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:418-21.
24. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod*. 2005;20:1006-12.
25. Dawson EB, Harris WA, Teter MC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*. 1992;58:1034-9.

26. Roff C, Cooper TG, Yeung CH. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double blind study. *Hum Reprod.* 1999; 14:1028-33.
27. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996;17:530-7.
28. Balercia G, Mosca F, Mantero F. Coenzyme Q 10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open uncontrolled pilot study. *Fertil Steril.* 2004;81:93-8.
29. Costa M, Canale D, Filicori M. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian study group on carnitine and male infertility. *Andrologia.* 1994;26: 155-9.
30. Lenzi A, Sgro P, Salacone P. A placebo controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2004;81:1578-84.
31. Sigman M, Glass S, Campagnone J. Carnitine for the treatment and idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2006;85:1409-14.