
SUMMARY

Objective: To evaluate the relationship between duration of sexual abstinence and sperm selection on sperm DNA fragmentation (SDF).

Design: Prospective study based on normozoospermic individuals.

Setting: Fertility and IVF unit and university unit for research.

Patient(s): Two cohorts of normozoospermic individuals: 21 men (aged 25–35 years) attending a clinic and with clearly adverse female factors; and a group of 12 selected donors (aged 20–25 years).

Intervention(s): SDF assessment using the sperm chromatin the dispersion test (Halosperm) in two cohorts of normozoospermic men.

Main Outcome Measure(s): SDF assessment after 24 hours of abstinence with recurrent ejaculation (one every 24 hours) using neat sperm samples; and SDF assessment before and after sperm selection with abstinence of 3 hours.

Result(s): Lower baseline levels of SDF were observed after shorter periods of abstinence between ejaculations (24 hours and 3 hours) than those recommended. This effect is much more marked after quick repetitive ejaculation (3 hours of abstinence) and sperm selection.

Conclusion(s): The present results challenge the role of abstinence in current male infertility treatments and suggest that SDF can be efficiently reduced by a biological practice consisting of short-term recurrent ejaculation coupled with effective sperm selection.

(Fertil Steril® 2011;95:554–7. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine. Traducción: *Rev Iberoam Fert Rep Hum*, 2011, 28: 79–84. ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *Male factor, sexual abstinence, sperm DNA fragmentation, sperm quality, sperm chromatin dispersion test.*

Un factor importante para la consecución de un embarazo sano es disponer de espermatozoides con el ADN intacto. Consecuentemente, en las técnicas de la reproducción asistida (TRAs), se han utilizado distintas estrategias para reducir la alta tasa de espermatozoides con SDF: 1) la selección directa *ex vivo* de espermatozoides que contienen el ADN intacto, 2) el uso de determinados fármacos que para disminuir la tasa de fragmentación del ADN espermático y 3) la obtención de los espermatozoides en el testículo. Las técnicas que se han utilizado para reducir la probabilidad de seleccionar un espermatozoide con el ADN dañado son el “swim-up” o la centrifugación en gradientes de densidad (1), por si solas o en combinación con abordajes más sofisticados como la inyección intracitoplasmática (ICSI) de espermatozoides morfológicamente seleccionados con alta resolución (2), el uso del ácido hialurónico para la selección de los espermatozoides antes de la ICSI (3) y la separación magnética por columnas de Anexina V (4). La administración de compuestos antioxidantes (5) o incluso de antibióticos también es eficaz para mejorar el resultado frente a determinadas incidencias como la presencia de una infección por *Chlamydia* (6). Finalmente, es posible que espermatozoides testiculares obtenidos mediante biopsia contengan una proporción inferior de SDF en comparación con espermatozoides eyaculados (7).

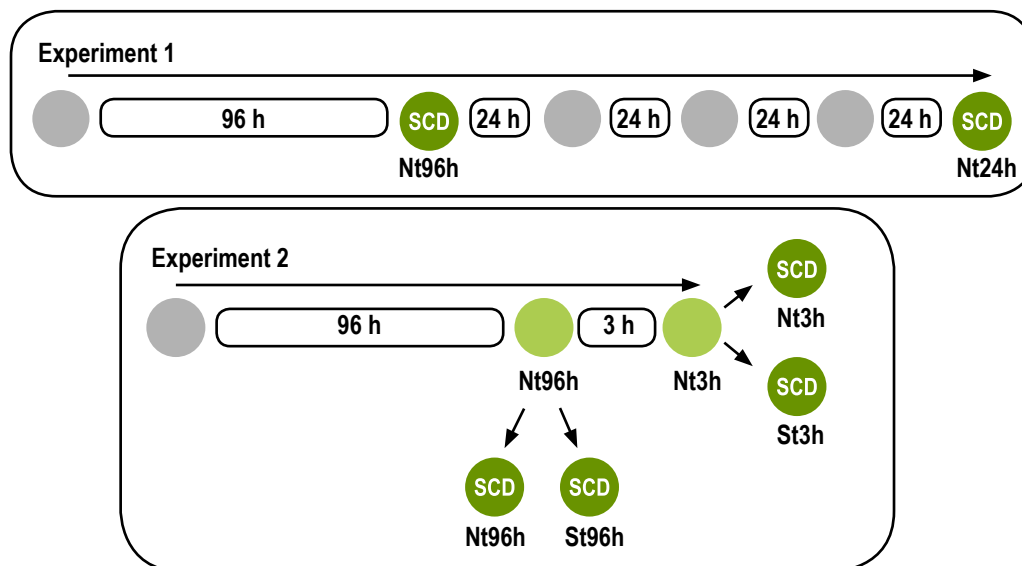
Cuando se recurren a las TRAs, como regla general, se recomienda un periodo de abstinencia sexual de 3 o 4 días como estrategia intralaboratorio para la homogeneización del resultado para evaluar los parámetros espermáticos. No obstante, no existen pruebas científicas determinantes que demuestren la utilidad de esta práctica para conseguir un embarazo sano, y por lo tanto su aplicación con la ICSI no se justifica en términos científicos en lo que se refiere a los objetivos de la reproducción. Es necesario, por lo tanto, evaluar la adecuación de la práctica de guardar un periodo prolongado de abstinencia y determinar si realmente resulta en la mejora de la calidad espermática. De hecho, algunos estudios han demostrado los efectos negativos de la abstinencia prolongada sobre algunos parámetros seminales (8, 9). El objetivo de este estudio prospectivo ha sido de analizar el efecto, sea positivo, negativo o neutral, de la eyaculación recurrente sobre la SDF.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó a partir de dos experimentos distintos. Un diagrama del diseño experimental en su conjunto se recoge en la [figura 1](#). El experimento 1 se llevó a cabo en un cohorte de 21 hombres normozoospermicos (25–35 años) asistiendo a una clínica por factores adversos para el embarazo que eran claramente femeninos. Cada indi-

FIGURA 1

Diagrama de la línea de tiempo del diseño experimental. Los tiempos de las eyaculaciones están indicados con círculos grises, los intervalos y tiempos de abstinencia, con cuadrados blancos y los tiempos de las pruebas para evaluar la fragmentación del ADN (SCD), con círculos grises. Los círculos verdes representan la muestra entera de eyaculado utilizada para producir las dos alícuotas para evaluación del daño producido en el ADN en las muestras netas y seleccionadas. Experimento 1: Nt96h: SDF en muestras netas de semen después de 96 horas de abstinencia; Nt24h: SDF en muestras netas de semen después de 24 horas de abstinencia dentro de una serie de eyaculaciones recurrentes cada 24 horas. Experimento 2: Nt96h: SDF en muestras netas de semen después de 96 horas de abstinencia; St96h: SDF en muestras seleccionadas de semen utilizando alícuotas equivalentes; Nt3h: SDF en muestras netas de semen después de 3 horas de abstinencia; St3h: SDF en muestras seleccionadas de semen utilizando alícuotas equivalentes.



Experiment = Experimento

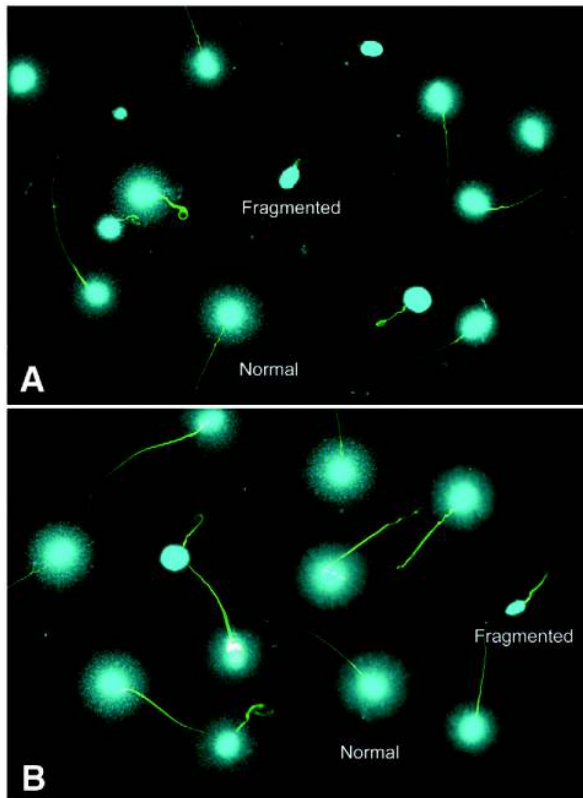
viduo se abstuvo de actividad sexual durante 4 días, después de los cuales los niveles de SDF se analizaron de manera inmediata (resultado neto 96 horas de abstinencia [Nt96h]; fig. 1, parte superior). Transcurrido este periodo, cada individuo continuó con eyaculaciones recurrentes (una cada 24 horas) durante 4 días consecutivos y se analizó la SDF de la última eyaculación (Nt24h; fig. 1, parte superior). En el experimento 2, un grupo de 12 donantes seleccionados (20-25 años) se abstuvo de actividad sexual durante 96 horas, tras las cuales se establecieron los niveles basales de SDF (Nt96h; fig. 1, parte inferior). Una muestra seminal adicional se obtuvo 3 horas después de esta primera eyaculación (resultado neto 3 horas de abstinencia [Nt3h]; fig. 1, parte inferior). En el segundo experimento, cada muestra (Nt96h y Nt3h; fig. 1, parte inferior) se dividió en dos alícuotas. La primera se consideró como semen neto (Nt3h), y la segunda se procesó por la técnica normalizada de centrifugación en gradientes de densidad para la selección espermática (selección a 3 horas de abstinencia [St3h]; fig. 1, parte inferior). La SDF se

evaluó en las cuatro nuevas subpoblaciones (Nt96h/St96h y Nt3h/St3h); fig. 1, parte inferior).

Para la selección espermática por el método de la centrifugación en gradientes de densidad, una alícuota de 1 ml de espermatozoides se distribuyó cuidadosamente en una columna consistente de 1 ml al 45% y 1 ml al 90% del material con gradientes de densidad (Sperm grad-TM; Vitrolife) en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los pellets se lavaron una vez con 5 ml de medio Sperm Prep (Medi-Cult), se centrifugaron a 300 x g durante 8 minutos y se resuspendieron en 0,5 ml del medio Sperm Prep al igual que en la fase de lavado. La fragmentación del ADN espermático se analizó con Halosperm (Halotech). La SDF se determinó a partir de los patrones de la dispersión de la cromatina espermática utilizando el kit Halotech (Halotech DNA), una variante comercial de la prueba de la dispersión de la cromatina espermática (SCD en sus siglas en inglés). Para cada uno de los experimentos, 25 ml de espermatozoides diluidos (10×10^6 espermatozoides/ml) se añadieron a

FIGURA 2

La fragmentación del ADN espermático visualizado después de la aplicación de la prueba SCD y coloreado con DAPI para el ADN y 2,7-dibromo-4-hidroxi-mercurio-fluoresceína (BMF) para proteínas. (A) Muestra fresca neta después de 3 horas de abstinencia y (B) muestra seminal equivalente tras la selección espermática. Se visualiza la reducción en la fragmentación del ADN espermático y la tendencia hacia la producción de halos homogeneizados de la dispersión de la cromatina.



Fragmented = Fragmentado
Normal = Normal

un vial conteniendo agarosa de bajo punto de fusión y se mezcló cuidadosamente. Una pequeña alícuota de la mezcla de agarosa y espermatozoides (10 ml) se extendió en diapositivas pre-tratadas (incluidas en el kit), se cubrieron éstas con un cubre objetos de cristal y se colocaron en la nevera sobre una placa metálica fría durante 5 minutos. Después de la solidificación de la muestra, se realizó un primer paso que incluyó la desnaturalización controlada del ADN utilizando una solución ácida durante 7 minutos a temperatura ambiente. Una vez desnaturalizado el ADN en las rupturas putativas, se procedió a la extracción controlada

de las proteínas nucleares. Los halos del ADN detectados en la prueba de la SCD se visualizaron con microscopía de fluorescencia después de colorear las muestras de ADN intercalado con fluorocromo 4', 6-diamino-2-fenilindol y dihidrocloruro (Invitrogen) en el medio Vectashield para prevenir alteraciones (Vector Laboratories). Para el protocolo de doble coloreado se utilizó GelRed para el ADN y 2,7-dibromo-4-hidroxi-mercurio-fluoresceína (BMF) para las proteínas específicas (Sigma-Aldrich). Para la visualización y captación se utilizó una cámara (Leica DFC350 FX; Leica Microsystem) con dos filtros de excitación independientes, ultravioleta y azul. Los archivos se fusionaron con Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems). Esto produjo nucleoides parcialmente desproteinizados donde los bucles de ADN se expanden para formar halos de dispersión de la cromatina en los espermatozoides libres de daño en su ADN. Los nucleoides de los espermatozoides cuyo ADN se encuentra fragmentado, o bien no desarrollan el halo de dispersión, o si lo desarrollan, éste es muy pequeño.

La comparación estadística se realizó con pruebas no paramétricas: la prueba U de Mann-Whiney para comparar los valores obtenidos entre dos grupos y la prueba Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. El valor de 0,05 se consideró significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v. 15.0.

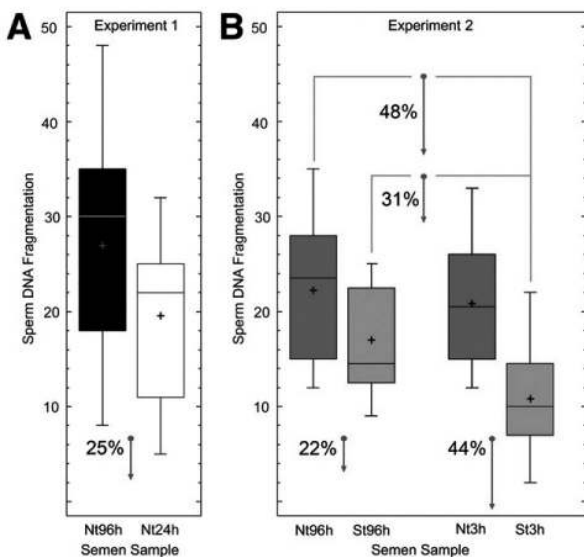
RESULTADOS

Utilizando el 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para el coloreado selectivo del ADN, y el BMF para el coloreado de proteínas, se produjeron imágenes de alta resolución después de procesar las muestras seminales con la prueba de la SCD. Las cabezas de los espermatozoides que presentaron el halo de la dispersión de la cromatina, que se forma con la expansión de los bucles de ADN a partir de un núcleo central a su vez formado de ADN y remanentes de proteínas, contienen una molécula putativa de ADN normal (fig. 2A). Las cabezas de los espermatozoides con halos pequeños o que no presentan halo alrededor de su núcleo son espermatozoides con el ADN fragmentado. La fig. 2B representa una muestra analizada tras 3 horas de abstinencia y después de la selección espermática, donde se observa que la tasa de espermatozoides con el ADN fragmentado se ha reducido notablemente. Otro aspecto a tomar en cuenta es que la combinación de la abstinencia breve, seguida de la selección espermática tiende a producir una población de espermatozoides con halos de dispersión de cromatina que son grandes y homogéneos (comparar la figuras 2A y 2B).

Las estadísticas descriptivas para ambos experimentos se recogen en la fig. 3. En el primer experimento, el nivel de

FIGURA 3

Diagrama caja-bigotes para comparar los niveles de SDF evaluados después de las diferentes duraciones de abstinencia (A, Experimento 1; B, Experimento 2). Para el Experimento 1, las cajas en negro, blanco y rojo representan muestras netas de semen. En el Experimento 2, las cajas rojas representan los espermatozoides seleccionados después de la centrifugación en gradientes de densidad. La intensidad de la reducción de la SDF se indica al lado de las flechas verdes. Experimento 1, Nt96h: la distribución de los valores de la SDF en muestras netas de semen después de 96 horas de abstinencia; Nt24h: la distribución de los valores de la SDF en muestras seleccionadas de semen después de 24 horas de abstinencia dentro de una serie de eyaculaciones recurrentes cada 24 horas. Experimento 2: Nt96h: la distribución de los valores de la SDF en muestras netas de semen después de 96 horas de abstinencia; St96h: la distribución de los valores de la SDF en muestras seleccionadas de semen utilizando alícuotas equivalentes; Nt3h: la distribución de los valores de la SDF en muestras netas de semen después de 3 horas de abstinencia; St3h: la distribución de los valores de la SDF en muestras seleccionadas de semen utilizando alícuotas equivalentes. La selección espermática se realizó con centrifugación en gradientes de densidad.



Sperm DNA Fragmentation = Fragmentación del ADN espermático
Semen Samples = Muestras de semen

SDF observada en la primera eyaculación (Nt96h) era de $26,9 + 11$ (media + DS), mientras que desciende a $19,6 + 8,4$ en las muestras recogidas después del periodo establecido para la eyaculación recurrente/abstinencia más corta (Nt24h), lo que supone una reducción de casi el 25% (fig. 3A), una diferencia estadísticamente significativa ($W =$

$134,5$; $P = 0,031$). En el experimento 2, en la primera eyaculación y en la de 3 horas después, tanto en la muestra neta como en la seleccionada, la prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias que eran significativas cuando se compararon todas las muestras ($H = 17,1$; $P = 0,006$). Cuando se analizaron las muestras de SDF obtenidas en este experimento por parejas, se observó que la tasa de SDF era de $22,2 + 7,4$ en la muestra Nt96h, mientras que era de $17,0 + 5,5$ en la muestra St96h ($Z = -3,06$; $P = 0,002$). Esto significa que la selección espermática produjo una disminución importante (casi del 22%; fig. 3B) del nivel de SDF en la muestra tomada a las 96 horas de abstinencia y sometida a la selección espermática. Para la segunda eyaculación, después de 3 horas de abstinencia, se observaron los siguientes resultados: $20,8 + 6,7$ en la muestra Nt3h y $10,8 + 6,3$ en la muestra St3h (fig. 3B). Las diferencias observadas eran altamente significativas ($Z = -2,78$; $P = 0,005$). Estos valores demuestran que la reducción de la frecuencia de la SDF es mucha más marcada en las muestras recogidas después de sólo 3 horas de abstinencia (comparar con los resultados en su conjunto en la fig. 3B). También se observó una reducción en la tasa de la SDF en el semen neto recogido después de 3 horas de abstinencia, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa (Nt96h vs. Nt3h; $W = 62,5$; $P = 0,60$). Además, se encontraron diferencias significativas cuando se compararon las fracciones seleccionadas (St96h vs St3h; $W = 32,9$; $P = 0,2$). Esto implica que después de sólo 3 horas de abstinencia, la selección espermática proporciona una herramienta muy eficaz para reducir la SDF (ver las estadísticas descriptivas en la fig. 3B). Por último, se comprobó el efecto global sobre la reducción de la SDF en la muestra de eyaculado recurrente después de sólo 3 horas de abstinencia y sometida a selección espermática al comparar la muestra Nt96h ($22,2 + 7,4$) con la St3h ($10,8 + 6,3$). Aquí se observó una reducción efectiva de la tasa de SDF de casi el 48% (fig. 3B), donde las diferencias son significativas ($W = 21,5$; $P = 0,003$).

DISCUSIÓN

Aunque quede claro que la práctica biológica de producir eyaculaciones recurrentes, seguida de una buena selección de espermatozoides son estrategias capaces de reducir la SDF de manera eficiente, existen unas diferencias sutiles en los experimentos que se han evaluado en este trabajo. Después de la abstinencia de 24 horas, pero sin practicar la selección de los espermatozoides (Experimento 1), se obtuvo una reducción de la SDF de casi el 25% (fig. 3). Esta reducción es similar a la obtenida tras la abstinencia de 24 horas seguida de la selección espermática (22%; Experimento 2, fig. 3), pero menor que la que se obtuvo después de 3 horas de abstinencia y la selección espermática (44%;

Experimento 2, *fig. 3*). La reducción efectiva de la SDF que se obtiene cuando se comparan las muestras recogidas después de 3 horas de abstinencia y sometidas a selección espermática en ambos grupos es alrededor del 31% (*fig. 3*). Además, en ambos experimentos, si se comparan los niveles de SDF en la muestra de semen neto recogida después de un periodo de abstinencia relativamente largo (24 horas) con los de la segunda muestra, recogida después de la abstinencia de sólo 3 horas, y sometida al proceso de selección, se obtiene una reducción de la SDF de cerca del 48% (*fig. 3*).

Los resultados aquí comunicados son preliminares, y es probable que esta práctica metodológica no produciría resultados equivalentes en pacientes con un factor masculino severo. No obstante, debido al carácter no invasivo de la misma, y debido al hecho de que su aplicación tiene un claro efecto positivo en el semen, parece que su uso puede ser beneficioso en parejas donde el hombre es normozoospermico y donde es el factor femenino el que limita la fertilidad, y por ello la pareja se va a someter a un proceso de ICSI. No descartamos efectos beneficiosos similares sobre la SDF en el contexto de la infertilidad masculina. De hecho, se ha sugerido que pacientes que presentan el factor de infertilidad masculino deban recoger muestras de semen después de sólo un día de abstinencia, ya que se ha observado que es en estas muestras moderadamente oligozoospermicas recogidas después de 1 día o 2 de abstinencia donde se producen los mejores picos de movilidad espermática y morfología normal (9).

Parece que la proporción de SDF se incrementa de manera significativa durante el tránsito desde los túbulos seminíferos hasta el epididimo. Es posible que esto se deba al estrés oxidativo, por lo que se supone que el daño al ADN se acumula en la población espermática debido al mal funcionamiento de las vías de reparación del ADN (10). De hecho los espermatozoides testiculares presentan niveles de SDF más bajos que los eyaculados; por lo tanto, la biopsia testicular se considera como posible método para cosechar las células espermáticas con el ADN más íntegro (7). Aunque esta técnica sea viable en el caso de hombres normozoospermicos, no parece que lo sea en casos de azoospermia: las muestras de hombres con azoospermia debida a una insuficiencia testicular presentan niveles mayores de SDF que las de hombres con azoospermia obstructiva (11).

En general, si es verdad que el estrés oxidativo en el epididimo aumenta la SDF, cuanto más tiempo permanezca el semen en el epididimo, más alto será el nivel de SDF. Por lo tanto, una reducción de este tiempo de almacenamiento

debería ayudar a impedir el aumento extratesticular de la SDF. No obstante, algunos autores han encontrado que estos efectos beneficios no son tan evidentes. De Jonge et al. (12) indican que la abstinencia no produjo ningún efecto estadísticamente significativo sobre parámetros como son la viabilidad, la movilidad total y de grado A, la morfología o la SDF. Es interesante notar que estos autores comunican algo que parece muy lógico, ya que es un hecho que el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura aumenta de manera estadísticamente significativa con 1 día de abstinencia. Una de las hipótesis que se evalúa en el presente trabajo es que entre los espermatozoides inmaduros producidos después de la eyaculación recurrente se acumulan niveles superiores de espermatozoides que contienen el ADN fragmentado, y como los espermatozoides inmaduros no se seleccionan tras la centrifugación en gradientes de densidad, se producen diferencias grandes entre la SDF observada en muestras netas y en muestras seleccionadas de semen. Los efectos beneficios de la eyaculación recurrente, una práctica no invasiva para reducir niveles de SDF, parecen evidentes sobre toda en la muestra resultante de la selección de los espermatozoides y probablemente esto compensaría cualquier posible efecto negativo producido a causa de los niveles superiores de especies reactivas de oxígeno (ROS en sus siglas en inglés) u otros radicales libres producidos por el procesado del semen. No obstante, es necesario profundizar en el estudio de estos temas en el contexto de la eyaculación recurrente. A este respecto, hay que señalar dos puntos: 1) Durante la separación de los espermatozoides del plasma seminal durante el procesado del semen, la producción de las ROS incrementa y éstas, a su vez, tienen un marcado efecto negativo en el funcionamiento del espermatozoide (13, 14); y 2) La mayor proporción de espermatozoides inmaduros que se cosechan después de eyaculaciones recurrentes producen un aumento del estrés oxidativo debido al contenido citoplasmático en las gotas proximales. Esto también puede empeorar la calidad del ADN, ya que estas alteraciones en los espermatozoides pueden también aumentar la producción de las ROS (15).

Queda claro que la eyaculación con menor periodo de abstinencia, seguida de la selección espermática pueden estar indicadas en los casos que requieren la ICSI. Sin embargo, no hemos de olvidar que la mayoría de los hombres experimentan un periodo refractorio inmediatamente después de la eyaculación, y éste se podría prolongar cuando el sujeto se encuentra en una situación de estrés, tal y como podría ser el tratamiento con la reproducción asistida. Eyaculaciones a corto plazo y recurrentes, que en contraste con la biopsia testicular, son métodos no invasivos para obtener espermatozoides y podrían suponer estrategias adecuadas

para mejorar la calidad del ADN de los espermatozoides que se utilizan en la ICSI. Para la IUI, esta estrategia podría estar limitada por la cantidad de espermatozoides finalmente recuperada, aunque su uso en esta indicación no se puede descartar sin mayor investigación.

Reconocimientos: Los autores quisieran agradecer a A. Gosálbez y B. Martín por su ayuda técnica, y al prof. Godfrey M. Hewitt por su lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, et al. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010;94:2626–30.
2. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:253–62.
3. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. “Physiologic ICSI”: hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010;93:598–604.
4. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;74:530–7.
5. Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl* 2011;13:374–81.
6. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* sp. *Fertil Steril* 2008;90:328–34.
7. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226–30.
8. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004;82:358–66.
9. Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I, Koifman A, et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril* 2005;83:1680–6.
10. Gil-Guzmán E, Ollero M, López MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001;16:1922–30.
11. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males, assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2009;92:1638–45.
12. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril* 2004;82:57–65.
13. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988;9:367–76.
14. Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 1999;72:496–9.
15. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 2005;83:95–103.