



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717439-0 A2



(22) Data de Depósito: 18/10/2007
(43) Data da Publicação: 19/11/2013
(RPI 2237)

(51) Int.Cl.:
A61K 45/06
A61P 15/08
A61K 31/00
A61K 45/08
A61K 31/194
G01N 33/50
A61K 38/17

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS PARA TRATAR SUBFERTILIDADE MASCULINA, PARA DETERMINAR UM ESTADO DE FERTILIDADE EM UM INDIVÍDUO DO SEXO MASCULINO, PARA A REPRODUÇÃO ASSISTIDA, PARA SELECIONAR UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E PARA SELECIONAR CÉLULAS DE ESPERMA EM UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE ESPERMA PARA USO EM UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO AUXILIADA.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2006 US 60/852402

(73) Titular(es): Periness LTD.

(72) Inventor(es): Benjamin Bartoov, Melamed Dobroslav, Ronen Yehuda

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT IL2007001250 de 18/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/047364de 24/04/2008

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS PARA TRATAR SUBFERTILIDADE MASCULINA, PARA DETERMINAR UM ESTADO DE FERTILIDADE EM UM INDIVÍDUO DO SEXO MASCULINO, PARA A REPRODUÇÃO ASSISTIDA, PARA SELECIONAR UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E PARA SELECIONAR CÉLULAS DE ESPERMA EM UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE ESPERMA PARA USO EM UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO AUXILIADA”

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a métodos e composições farmacológicas e mais especificamente a tais métodos e composições farmacológicas para uso no diagnóstico e tratamento de subfertilidade masculina.

LISTA DE TÉCNICA ANTERIOR

O seguinte é uma lista de referências da técnica anterior que são consideradas como sendo pertinentes para a compreensão da invenção. A indicação destas referências aqui será às vezes feita por indicação de seu número da lista abaixo em parêntese.

1. Isidori A, Latini M, Romanelli F.(1) Isidori A, Latini M, Romanelli F. Treatment of male infertility. *Contraception*. 2005 Oct;72(4):314-8.
2. Kerin JFP, Peek J, Warms GM, Kirby C, Jeffrey R, Matthews CD, Cox LW (1984) Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet* 1:533-534.
3. Ombelet W, Puttemans P, Bosnians E (1995) Intrauterine insemination: a first step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. *Hum Reprod* 10:90-102.
4. Hinting A, Comhaire F, Vermeulen L, Dhont M, Vermeulen A, Vandekerckhove D (1990) Possibilities and limitations of techniques of assisted reproduction for the treatment of male infertility. *Hum Reprod* 5:544-548.
5. Comhaire F, Milingos S, Liapi A, Gordts S, Campo R, Depypere H, Dhont

M, Schoonjans F (1995) The effective cumulative pregnancy rate of different modes of treatment of male infertility. *Andrologia* 27:217-221.

6. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rozenwaks Z (1995) Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril* 63:1231-1240.

7. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med*. 2001 Oct 4;345(14):1067-8.

8. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. Dez. 2003; 80(6):1413-9.

9. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online*. 2006 May;12(5):634-8.

10. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth edition 1999. World Health Organization. Cambridge university press.

11. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl*. Fev. De 2006; 29(1):69-75; discussion 105-8.

12. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. jan.-fev. de 2002;23(1):1-8.

13. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*. Nov. de 1998; 20(11):955-64.

14. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9188-92.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Atualmente, no mundo ocidental, cerca de um par dentre cinco é subfértil. A subfertilidade é definida como uma falha de conceber após 1 ano de intercurso sexual sem proteção. Em cerca de metade dos pares subférteis, a subfertilidade masculina é observada, e em quase 40% destes pares, a subfertilidade é apenas devido a fatores do sexo masculino.

O estado de fertilidade masculina é avaliado por uma análise do sêmen. A análise mais comum, conhecida como "análise de rotina do sêmen", provê informação sobre o número de espermatozóides presentes no ejaculado, a proporção de células de esperma capazes de mover-se (e/ou capazes progressivamente) e a porcentagem de células que são morfolologicamente normais. A subfertilidade masculina é geralmente associada com um ou mais dentre produção baixa de esperma (oligozoospermia), motilidade fraca do esperma (astenozoospermia) e morfologia de esperma anormal (teratozoospermia). A combinação de todos os três destes defeitos ("*oligoastenoteratozoospermia*" OTA) é a causa mais comum de subfertilidade masculina. A probabilidade de concepção aumenta com aumentada concentração de esperma, motilidade e morfologia normal. A Organização Mundial de Saúde (WHO) propôs diretrizes especificando os valores de limiar para estes parâmetros para classificar as amostras de sêmen como normais ou anormais (10).

A análise de rotina de sêmen, no entanto, tem muitas limitações resultando em uma proporção significativa de pacientes demonstrando subfertilidade não explicada. Para refinar o diagnóstico, testes adicionais foram desenvolvidos que provêm mais informação sobre o potencial de fertilização de sêmen humano. Estes testes incluem vários testes funcionais de células de esperma (11), testes de morfologia funcional como o "*exame de morfologia de organelo do esperma capaz de mover-se*", (MSOME, 12), e testes examinando a extensão de dano ao DNA em células

de esperma, por exemplo, o teste de estrutura de cromatina de esperma (SCSA, 11).

Em alguns casos, a causa de subfertilidade masculina é conhecida. Estas incluem varicocele, distúrbios hormonais, infecções, 5 infertilidade imunológica, obstrução do trato genital masculino, e criptorquidismo. As terapias médicas e cirúrgicas atuais são disponíveis para estas condições (1). No entanto, em um grande número de casos de subfertilidade masculina, a causa não é conhecida. Nestes casos, vários tratamentos podem ser aplicados ao homem subfétil, com frequência em uma 10 base ad hoc. Estes tratamentos incluem antiestrogênicos, inibidores de aromatase, androgênicos, FSH, pentoxifilina, arginina, carnitina, glutathione, vitaminas (A, C e E) e oligominerais (zinco, selênio), (I).

Quando um tratamento de infertilidade masculina não leva a uma gravidez após um período de tempo razoável ou se as medidas 15 diagnósticas não mostram que uma melhora no estado de fertilidade é possível, então técnicas de reprodução assistida (ART) podem ser consideradas. Os vários procedimentos de reprodução assistida melhoram o potencial de fertilização do esperma ao se desviar de algumas ou todas as barreiras de migração do trato genital feminino superior e inferior assim como 20 os investimentos no ovo. Os procedimentos ART que são comuns agora incluem inseminação intrauterina (IU 1, 2, 3), fertilização *in vitro* clássica (IVF, 4, 5) e injeção de esperma intracitoplásmica IVF (IVF-ICSI, 6). Uma melhora em ICSI é uma técnica conhecida como "*injeção selecionada morfológicamente intracitoplásmica*" (IMSI, 7-9), em que a morfologia fina 25 de espermatozóides capazes de mover-se é examinada por microscopia potente e os espermatozóides demonstram a melhor morfologia dos núcleos são selecionados para ICSI.

As células de esperma de várias espécies tem sido conhecidas *in vitro* para ligar e absorver DNA exógeno (13). A ligação de DNA é

mediada pelo menos em parte por CD4 e moléculas MHCII presentes sobre a superfície das células de esperma e é antagonizada pela glicoproteína IF-1, presente no fluido seminal. A interação do esperma com DNA acelular extracelular ativa as nucleases intracelulares como DNase que clivam o DNA genômico do esperma, eventualmente levando a um processo de morte de células que se parece com apoptose.

DNase I bovino foi usado clinicamente desde 1965. Ele foi usado antes nos países da União Soviética, para tratar infecções causadas por vírus de DNA como Herpes e adenovírus. Acredita-se que DNase degrada o DNA viral em mono- e oligonucleotídeos. Este medicamento é geralmente usado para tratar infecção por Herpes simples tipo 2 (herpes genital), infecções herpéticas o olho causadas por Herpes simples, infecções por Herpes zoster, inflamação do trato respiratório como bronquite e pneumonia e tuberculose. Para estas aplicações, ela é administrada ou por injeções intramusculares, inalação ou colírio. DNase humano recombinante I é outro DNase I clinicamente usado. Ele é um remédio aprovado pelo FDA administrado por inalação para tratar pacientes com fibrose cística (CF). Nestes pacientes, a retenção de secreções purulentas viscosas nas vias aéreas contribui tanto para uma redução função pulmonar como exacerbação de infecções. As secreções pulmonares purulentas contém concentrações muito altas de DNA extracelular liberado por degeneração de leucócitos que se acumulam em resposta à infecção. DNase I hidrolisa o DNA no esputo de pacientes CF e reduz a viscoelasticidade do esputo (14).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada em uma nova e inesperada descoberta de que níveis elevados de deoxioligonucleotídeo acelular presente na circulação do sangue do homem são associados com subfertilidade e que a administração de DNA acelular exógeno reduz a qualidade do esperma e causa a subfertilidade. Os inventores assim descobriram que provendo

5 pessoas do sexo masculino subfêrteis com um DNase pode melhorar a qualidade de sêmen e o potencial de fertilidade.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, provê-se uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina. A
5 composição farmacêutica da invenção compreende ou um agente que bloqueia o efeito das moléculas de ácido deoxirribonucleico acelular sobre as células de esperma ou um agente que induz a produção de uma substância endógena que bloqueia o efeito das moléculas de ácido deoxirribonucleico
10 acelular sobre as células de esperma. A estimulação de células acinares pancreáticas e parótidas pode ser exercida usando ou inositol 1,4,5- trisfosfato (InsP₃) que ativa o receptor de InsP₃ ou por Ca²⁺ que ativa os receptores de rianodina. A ativação destes dois receptores causa a liberação de Ca²⁺ em células acinares, iniciando a secreção a partir destes órgãos. A composição farmacêutica da invenção irá ainda incluir um veículo farmaceuticamente
15 aceitável.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, provê-se um método para o tratamento de uma pessoa do sexo masculino, o método compreendendo administrar à pessoa do sexo masculino ou um agente que
20 bloqueia o efeito de moléculas de ácido deoxirribonucleico acelular sobre as células de esperma ou um agente que induz a produção de uma substância endógena que bloqueia o efeito de moléculas de ácido deoxirribonucleico acelular sobre as células de esperma.

De acordo com uma forma de realização preferida, o agente é uma proteína, preferivelmente uma enzima que afeta o nível de moléculas de
25 ácido deoxirribonucleico acelular em fluidos do corpo. De acordo com esta forma de realização, a enzima é preferivelmente uma deoxirribonuclease (DNase). DNase pode ser uma endodeoxirribonuclease ou exodeoxirribonuclease (endodeoxirribonuclease cliva dentro das moléculas enquanto a exodeoxirribonuclease cliva de uma extremidade das moléculas,

ou 3' ou 5').

Uma ampla variedade de DNases são conhecidas, que diferem em suas especificidades de substrato, mecanismos químicos, e funções biológicas. As DNases não limitativos que são aplicáveis de acordo com a invenção são DNase I, DNase II, DNase gama, DNase ativado por caspase (CAD), L-DNase II, DHPH. De acordo com uma forma de realização preferida da invenção, a DNase é DNase 1. DNase pode ser de origem animal, vegetal, bacteriana, viral, de levedura ou de protozoário ou pode ser DNase recombinante, preferivelmente DNase recombinante, preferivelmente DNase recombinante humana.

De acordo com outra forma de realização da invenção, o agente pode ser uma molécula que interfere com a capacidade da molécula de ácido deoxirribonucleico de ligar aos receptores na superfície das células de esperma. Estas moléculas podem ser moléculas que ligam e bloqueiam os receptores ou moléculas que ligam e bloqueiam as moléculas de ácido deoxirribonucleico. As moléculas que bloqueiam o receptor podem ser de baixo peso molecular, por exemplo dímeros de deoxirribonucleotídeos, fosfodeoxiribosil pirofosfato (PdRPP), deoxirribonucleotídeos ou íon metal ou peso molecular elevado, como peptídeos, polipeptídeos, proteínas, anticorpos ou glicoproteínas. Em uma forma de realização preferida, a molécula é glicoproteína IF-1, ou um análogo da mesma, capaz de bloquear a interação de DNA acelular com receptores de células de esperma. As moléculas que ligam e bloqueiam as moléculas de ácido deoxirribonucleico podem ser peptídeos, polipeptídeos, proteínas, proteínas de ligação a DNA, proteínas nucleares (como histonas, protaminas), ou anticorpos. As moléculas de ácido deoxirribonucleico podem também exercer um efeito deletério sobre as células de esperma por ligação na superfície de proteínas de células de esperma e lipídeos que não são receptores. Neste caso, o agente pode ser uma molécula que interfere com esta ligação.

De acordo com outra forma de realização da invenção, o agente pode ser uma molécula que bloqueia um estágio em uma via de transdução de sinal gerada por ligação da molécula de ácido deoxirribonucleico a receptores na superfície de células de esperma. O agente
5 pode ser um composto de baixo peso molecular ou um polímero, por exemplo, inibidores de caspase como ZVAD e família de proteína bcl-2 ou proteínas negativas dominantes de caspase.

O dano às células de esperma causado por DNA acelular pode envolver uma atividade de DNase elevada dentro das células de esperma.
10 Assim, de acordo com outra forma de realização da invenção, a composição farmacêutica da invenção pode compreender um inibidor de DNase que inibe a transgênico de DNase endógeno dentro das células de esperma. O agente pode ser um composto de baixo peso molecular ou um polímero. Os agentes preferidos incluem ácido aurintricarboxílico (ATA) ou ácido cítrico ou um
15 análogo funcional do mesmo.

A composição pode incluir em combinação com o agente veículos farmacêuticamente aceitáveis. Pelo termo "*veículo farmacêuticamente aceitável*" significa-se que qualquer um dentre os excipientes inertes, não tóxicos, que essencialmente não reagem com o agente
20 que interfere com o DNA tendo um efeito sobre as células de esperma e é adicionado às mesmas a fim de dar forma ou consistência à composição e para prover proteção contra degradação do agente e aumentar sua sobrevivência fora e dentro do corpo e para obter penetração dentro do corpo e distribuição nos fluidos do corpo e para facilitar a distribuição do agente no
25 corpo do indivíduo e a distribuição ao sítio alvo (ou o DNA acelular, para o receptor de superfície de célula alvo ou para entrar na célula de esperma.

De acordo com uma forma de realização, a composição está em uma forma apropriada para administração oral. De acordo com outra forma de realização, a composição está em uma forma apropriada, para

injeção, preferivelmente injeções intramuscular (IM), subcutânea, ou intravenosa (i.v.). De acordo com ainda outra forma de realização, a composição está na forma apropriada para inalação. Apesar de outras formas de administração serem também aplicáveis, nota-se que a administração oral é
5 uma via preferida de acordo com a invenção devido a uma melhor aderência ao tratamento.

As amostras de sêmen obtidas de homens tratados pelo método da invenção podem ser usadas em técnica de reprodução assistida convencional (ART). Uma lista não limitativa de técnicas de reprodução
10 assistida incluem inseminação intra-uterina (IUI), fertilização *in vitro* (IVF clássica); injeção de espermatozoides intra-citoplásmica (ICSI) e injeção selecionada morfológicamente intra-citoplásmica (IMSI), assim como outras técnicas bem conhecidas na arte de fertilidade.

O agente de acordo com a invenção é administrado e dosado
15 de acordo com a boa prática médica, levando em conta a condição clínica do indivíduo do sexo masculino, o sítio e método de administração, esquema de administração, idade do indivíduo, peso corporal e outros fatores bem conhecidos dos médicos. As doses podem ser únicas ou doses múltiplas em um dia único ou em um período de vários dias/semanas/meses (etc). O
20 tratamento geralmente tem uma extensão proporcional à severidade da condição de subfertilidade, eficácia do agente e o indivíduo do sexo masculino sendo tratado.

A dosagem pode ser prontamente determinada por administração a uma pluralidade de indivíduos testados (indivíduos
25 demonstrando subfertilidade) com várias quantidades de agente testado e então traçando em gráfico a mudança na qualidade do sêmen como uma função da dosagem. Alternativamente, a dosagem pode ser determinada através de experiências realizadas em modelos de animais apropriados, e então extrapolando para seres humanos usando um dentre uma pluralidade de

métodos de conversão. Como conhecido, a quantidade que é considerada como eficaz em um indivíduo pode depender de vários fatores, como o modo de administração (por exemplo administração oral pode requerer uma dose maior para obter um dado nível no plasma do agente do que uma administração intravenosa); a idade, peso, área de superfície do corpo, condição de saúde, e fatores genéticos do indivíduo, assim como os fármacos sendo simultaneamente administrados ao indivíduo.

A duração do tratamento será determinada de acordo com a quantidade e qualidade do sêmen. A espermatogênese ocorre nos testículos e dura aproximadamente 64 dias em humanos. Ela é seguida por 8-10 dias de transporte epididimal (EPT). O efeito deletério de DNA acelular é observado em seções diferentes do trato genital do indivíduo do sexo masculino: os túbulos seminíferos dos testículos e a cauda epididymis. Assim, DNA acelular pode afetar diferentes estágios de espermatogênese, produzindo dano às células de esperma manifestadas em diferentes níveis de severidade. O dano aos testículos é tanto quantitativos como qualitativo enquanto o dano epididimal é principalmente qualitativo. Assim, a duração do tratamento pode variar e deve ser determinada de acordo com a quantidade e qualidade do sêmen. A duração do tratamento é preferivelmente selecionada dentro os seguintes regimes:

Tratamento agudo

A. 10 dias. Este curso visa reduzir o efeito de DNA acelular em células de esperma durante transporte epididimal.

B. 16 dias. Este curso visa reduzir o efeito de DNA acelular em células de esperma durante a fase de amadurecimento da espermiogênese e durante o transporte epididimal.

C. 26 dias. Este curso visa reduzir o efeito de DNA acelular em células de esperma durante o ciclo espermatogênico e durante o transporte epididimal.

D. 32 dias. Este curso visa reduzir o efeito de DNA acelular em células de esperma durante a espermiogênese completa e durante o transporte epididimal.

Tratamentos crônicos

5 E. 74 dias. Este curso visa reduzir o efeito de DNA acelular em células de esperma durante a espermatogênese completa e durante o transporte epididimal.

A invenção também provê métodos para avaliar o potencial de fertilidade masculina. De acordo com este aspecto da invenção, o nível de moléculas de ácido deoxirribonucleico acelulares e/ou um agente que inibe o efeito da molécula de ácido deoxirribonucleico acelular sobre as células de esperma é determinado em um fluido corporal de um indivíduo. Quando o nível das moléculas de ácido deoxirribonucleico acelulares é estatisticamente significativamente maior do que um limiar predefinido e/ou referida quantidade de referido nível de agente é estatisticamente significativamente menor do que um limiar predefinido, o indivíduo é diagnosticado como tendo subfertilidade. De acordo com uma forma de realização preferida, o agente é uma proteína, preferivelmente uma enzima que afeta o nível de moléculas de ácido deoxirribonucleico acelulares nos fluidos corporais. De acordo com esta forma de realização, a enzima é preferivelmente uma deoxirribonuclease (DNase). De acordo com os resultados da determinação, uma técnica de reprodução assistida ótima ART pode ser selecionada a fim de superar a subfertilidade. O fluido corporal pode ser, por exemplo, sangue total, plasma sanguíneo, soro do sangue, sêmen, plasma seminal, fluido da linfa, suor, saliva ou lágrimas.

De acordo com outra forma de realização, uma atividade de um marcador indicativo de potencial de fertilidade masculina é determinada em células de esperma. Quando a atividade é estatisticamente significativamente maior do que um limiar predefinido, o indivíduo é

diagnosticado como sendo subfértil. De acordo com os resultados da determinação, um ART ótimo pode ser selecionado a fim de superar a subfertilidade. Os inventores verificaram que a injeção intravenosa de moléculas de ácido deoxirribonucleico a mamíferos do sexo masculino induziu a ativação de marcadores apoptóticos receptor Fas, caspas 3 e deoxirribonuclease endógena (DNase) em suas células de esperma e que a expressão elevada do receptor Fas sobre a superfície das células de esperma é indicativa de subfertilidade. Assim, o marcador pode ser uma proteína associada com apoptose e de acordo com esta forma de realização, a proteína associada com apoptose é preferivelmente o receptor Fas de superfície de célula, o marcador intracelular caspase-3 ou deoxirribonuclease endógena (DNase). outro marcador é o complexo DNA-DNA receptor. A expressão de receptor Fas sobre as células de esperma pode ser determinada imunologicamente usando anticorpos de receptor anti Fas. Os anticorpos podem ser detectados ou por conjugação em um corante fluorescente ou usando qualquer método bem conhecido (imuno-histoquímica, peroxidase, fosfatase alcalina e outros).

A invenção também provê um método para selecionar uma sub-população de células de esperma tendo uma capacidade de concepção melhorada para uso na técnica de reprodução assistida, compreendendo remover de uma amostra de sêmen células de esperma que expressam um marcador de membrana indicativo de apoptose de modo a obter a referida sub-população de células de esperma. Um marcador preferido é o receptor Fas. Outro marcador é o complexo DNA-DNA receptor. Preferivelmente, a seleção de células de esperma que expressam o marcador utiliza um anticorpo contra o marcador. As células de esperma que reagem com o anticorpo são reconhecidas como as incapazes de obter uma gravidez durável e são removidas da amostra. O anticorpo pode ser rotulado de modo fluorescente em cujo caso as células de esperma ligadas aos anticorpos são removidas

usando um classificador de células ativado por fluorescência. O anticorpo pode ser ligado a contas de resina e as células de esperma não ligadas são separadas das células de esperma ligadas a resina usando uma coluna, centrifugação ou imãs.

5 Assim, em um de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para o tratamento da subfertilidade masculina compreendendo uma enzima que degrada DNA e um veículo fisiologicamente aceitável.

10 Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo uma substância que bloqueia a interação entre o DNA acelular e receptores de superfície de células de esperma e um veículo fisiologicamente aceitável.

15 Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo uma substância que liga a DNA e um veículo fisiologicamente aceitável.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo uma substância que inibe DNase de células de esperma endógenas e um veículo fisiologicamente aceitável.

20 Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo uma substância que inibe um membro de uma via de transdução de sinal mediada por ligação de DNA a receptores de superfície de células de esperma e um veículo fisiologicamente aceitável.

25 Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito antifertilidade do DNA acelular sobre as células de esperma e um veículo fisiologicamente aceitável.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de uma enzima que degrada DNA.

5 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método pra o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de uma substância que bloqueia a interação entre DNA acelular e receptores de superfície de células de esperma.

10 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de uma substância que liga DNA.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de uma substância que inibe DNase de células de esperma endógenas.

15 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de uma substância que inibe um membro de uma via de transdução de sinal mediada por ligação de DNA a receptores de superfície de células de esperma.

20 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para o tratamento de subfertilidade masculina compreendendo a administração de um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito de antifertilidade de DNA acelular em células de esperma.

25 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para a determinação do estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino, compreendendo:

(a) obter do indivíduo uma amostra de um tecido ou fluido corporal;

(b) medir na amostra um nível de DNA acelular ou um nível

de um agente que causa uma redução no efeito do DNA acelular em células de esperma;

(c) comparar o nível medido em um ou mais valores de limiar predeterminados; e

5 (d) determinar o estado de fertilidade com base na comparação.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para a determinação do estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino compreendendo:

10 (a) obter do indivíduo uma amostra contendo células de esperma;

(b) medir nas células de esperma um nível de uma substância indicativa de apoptose;

15 (c) comparar o nível medido a um ou mais valores de limiar predeterminados; e

(d) determinar o estado de fertilidade com base na comparação.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para a reprodução assistida, compreendendo:

20 (a) obter uma amostra contendo células de esperma de um indivíduo do sexo masculino tratado pelo método da invenção;

(b) utilizar a amostra em uma técnica de reprodução assistida (ART).

25 Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para selecionar uma técnica de reprodução assistida (ART) compreendendo:

(a) determinar um estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino pelo método da invenção;

(b) determinar um ART com base no estado de fertilidade.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um processo para

selecionar células de esperma em uma população de células de esperma para uso em uma técnica de reprodução assistida, compreendendo:

(a) obter uma amostra de sêmen contendo células de esperma;

e

5 (b) remover da amostra de sêmen células de esperma que expressam um marcador apoptótico de modo a obter uma sub-população de células de esperma.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê uma composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina compreendendo um agente selecionado dentre:

10

a) um agente que causa redução em um efeito de DNA extracelular sobre células de esperma; e

(b) um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre

15

células de esperma;
junto com um veículo fisiologicamente aceitável.

Em outro de seus aspectos, a invenção provê um método para tratar subfertilidade masculina compreendendo administrar um agente selecionado dentre:

20

(a) um agente que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre células de esperma; e

(b) um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre as células de esperma.

25

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A fim de compreender a invenção e verificar como ela pode ser realizada na prática, uma forma de realização preferida será agora descrita, por meio de exemplos não limitantes apenas, com referência aos desenhos anexos, em que:

Figura 1 é um histograma mostrando a concentração de DNA em homens férteis e subférteis;

Figura 2 mostra um histograma do efeito de injeções de DNA sobre o potencial de fertilidade de camundongos machos;

5 Figura 3 é um histograma mostrando o efeito de injeção de DNA acelular em camundongos sobre a estabilidade de cromatina em células de esperma;

10 Figura 4 é um histograma mostrando o efeito de injeção de DNA acelular em camundongos sobre a porcentagem de células de esperma expressando receptor Fas;

Figura 5 é um histograma mostrando o efeito de injeção de DNA acelular em camundongos sobre atividade de caspas 3 em suas células de esperma;

15 Figura 6 é um histograma mostrando o efeito de injeção de DNA acelular em camundongos sobre atividade de DNase endógeno em suas células de esperma;

Figura 7 mostra dano morfológico causado em tecido de testículo por injeção de DNA;

20 Figura 8 mostra dano apoptótico causado em tecido de testículo por injeções de DNA (coloração TUNEL);

Figura 9 mostra a quantificação do dano apoptótico causado em tecido de testículo por injeções de DNA;

Figura 10 mostra dano morfológico e apoptótico causado em tecido de testículo por injeções de DNA (coloração TUNEL);

25 Figura 11 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a densidade do esperma em sêmen de homens subférteis;

Figura 12 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a motilidade de esperma em sêmen de homens

subférteis;

Figura 13 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a motilidade progressiva no sêmen de homens subférteis;

5 Figura 14 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a porcentagem de células de esperma normais no sêmen de homens subférteis como realizado de acordo com WHO usando microscopia de luz;

10 Figura 15 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a porcentagem de células de esperma com defeitos de cabeça diferentes no sêmen de homens subférteis como realizado de acordo com o WHO usando microscopia de luz;

15 Figura 16 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a porcentagem de células de esperma com cabeças amorfas no sêmen de homens subférteis como realizado de acordo com o WHO usando microscopia de luz;

20 Figura 17 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a porcentagem de células de esperma com defeitos de peças intermediárias no sêmen de homens subférteis como realizado de acordo com o WHO usando microscopia de luz;

Figura 18 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre estabilidade de cromatina em células de esperma no sêmen de homens subférteis;

25 Figura 19 é um histograma mostrando o efeito de injeções de DNase intramusculares sobre a porcentagem de células de esperma expressando o receptor Fas no sêmen de homens subférteis;

Figura 20 é um histograma mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre a densidade do esperma;

Figura 21 é um gráfico mostrando o efeito da administração

oral de DNase sobre o volume de sêmen;

Figura 22 é um histograma mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre a concentração de células de esperma;

Figura 23 é um gráfico mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre a porcentagem de células de esperma com morfologia de núcleo normal realizada por MSOME;

Figura 24 é um gráfico mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre o número de células de esperma com morfologia de núcleo normal realizada por MSOME;

Figura 25 é um histograma mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre a porcentagem de células de esperma com morfologia de cabeça estreita como realizado por MSOME;

Figura 26 é um histograma tendo o efeito da administração oral de DNase sobre a estabilidade de cromatina em células de esperma;

Figura 27 é um gráfico mostrando o efeito da administração oral de DNase sobre a porcentagem de células de esperma expressando o receptor Fas;

Figura 28 é um gráfico mostrando o efeito da inalação de DNase sobre a porcentagem de células de esperma com morfologia de núcleo normal realizada por MSOME;

Figura 29 é um histograma mostrando a inibição da atividade de DNase de células de esperma internas pelo inibidor de DNase citrato;

Figura 30 é um histograma mostrando a expressão do receptor Fas sobre a superfície de células de esperma de homens férteis e subférteis;

Figura 31 é um histograma mostrando a atividade de caspas 3 tanto em células de esperma expressando o receptor Fas como células de esperma expressando o receptor não Fas de homens subférteis;

Figura 32 é um histograma mostrando o número de descendências obtidas em inseminação artificial de camundongos usando

tanto células de espermatozoides expressando o receptor Fas como células de espermatozoides expressando o receptor não Fas;

Figura 33 é um histograma mostrando o número de zigotos 2PN obtidos em inseminação de camundongo usando tanto células de espermatozoides expressando o receptor Fas como células de espermatozoides expressando o receptor não Fas;

Figura 34 mostra um desenvolvimento embrionário em camundongos após fertilização natural ou após inseminação artificial usando tanto células de espermatozoides expressando o receptor Fas como células de espermatozoides expressando o receptor não Fas;

Figura 35 é um histograma mostrando a porcentagem de células de espermatozoides expressando receptor Fas no sêmen de homens subfértiles que tanto foram bem-sucedidos como falharam em um tratamento com IUI; e

Figura 36 é um histograma mostrando a atividade de DNase em plasma sanguíneo de camundongo após administração de DNase.

EXEMPLOS

Materiais

Solução de DNA padrão:

100 ml de DNA de timo de bezerro foram dissolvidos em água destilada em dobro (DDW).

Solução de DPA:

1,5 g de difenilamina foram dissolvidos em 100 ml de ácido acético glacial e 1,5 ml de ácido sulfúrico foram adicionados. No dia do uso, 0,5 ml de acetaldeído foi adicionado.

Solução de polivinil pirrolidona (PVP):

Meio PVP 1089000 obtido de Medi-Cult.

Tampão de reação de atividade de DNase de Kunitz:

MgSO₄ 5 mM x 7H₂O, Acetato de Na 0,1 M pH 5, 4 mg% de DNA de timo de bezerro.

Métodos

Níveis de DNA e de deoxioligonucleotídeo (método de Burton):

Solução de DNA padrão foi diluída em 5, 10, 20 e 50 µg/ml em 166 µl. Para cada 166 µl de amostras de plasma ou amostra de DNA padrão, 166 µl de HClO₄ 1N e 664 µl de solução de DPA foram adicionados. As amostras foram incubadas a 37°C durante 20 h, e então centrifugadas durante 10 min (15.000 g, 37°C), 300 µl do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 cavidades e medidos em um espectrofotômetro a 600 nm.

Volume de sêmen, densidade de esperma e concentração de esperma:

10 O volume de cada ejaculado de sêmen foi medido usando uma pipeta.

A concentração de esperma foi determinada contando as células usando tanto hemocitômetro de Helber como hemocitômetro de Neubauer (Helber é usado quando a concentração de esperma é alta e 15 Neubauer quando é baixa).

A densidade de esperma (= número de células no ejaculado total) foi calculada multiplicando-se o volume de ejaculado pela concentração de esperma.

Motilidade de esperma e motilidade progressiva:

20 Células de esperma capazes ou não de mover-se foram contadas usando tanto hemocitômetro de Helber como hemocitômetro de Neubauer e a porcentagem de células de esperma capazes de mover-se conseqüentemente foi calculada. Uma amostra de 20 células de esperma móveis aleatórias foi examinada para motilidade progressiva examinando sua capacidade de progredir 25 em uma linha reta até 200 µm e a porcentagem de célula de esperma capaz de mover-se progressivamente foi conseqüentemente calculada.

Morfologia do esperma usando a técnica de coloração com eosina-nigrosina:

Células de esperma foram coloridas usando 2% de eosina, uma

coloração nuclear e 10% de nigrosina para o fundo. 50 células de espermatozoides foram avaliadas usando microscopia de luz em uma amplitude de 1000x sob óleo de imersão. A análise da morfologia do espermatozoides foi medida de acordo com as guias WHO (10).

5 **Exame da morfologia de organelas de espermatozoides capazes de se mover no seco e úmido (regular) (MSOME):**

Preparação de espermatozoides para observação morfológica em MSOME úmido (regular):

10 Uma alíquota de 1-2 µl da suspensão de espermatozoides contendo alguns milhares de espermatozoides foi transferida para uma microgotícula de meio de espermatozoides contendo solução de polivinil pirrolidona (PVP) a 0%-8% e colocada em um prato de fundo de vidro sob óleo de parafina. A avaliação morfológica de células de espermatozoides em movimento tornou-se possível pela criação de pequenas baias estendendo-se do aro das gotículas, que capturaram

15 as cabeças dos espermatozoides capazes de se mover.

Preparação de espermatozoides para observação morfológica em MSOME seco:

Ejaculado novo pós-liquefação foi transferido para tubos de fundo redondo em temperatura ambiente (22-25°C). O grânulo mole de células de espermatozoides ejaculados foi obtida por centrifugação em recipientes

20 com balanço em 1500 RPM durante 15 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante do plasma seminal foi removido. O grânulo de espermatozoides foi colocado em suspensão em 1 ml de meio IFV Fercult (FertiPro N.V. Beernem, Bélgica) e então re-centrifugado em 1500 RPM durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Os tubos foram então transferidos para um

25 incubador a CO₂ a 5%, a 37°C durante uma incubação oscilante, inclinados a 45°. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido até a interfase do grânulo de espermatozoides. O sobrenadante oscilante foi centrifugado a 1500 RPM durante 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O grânulo foi esfregado em lâminas de vidro de microscópio e secado em ar.

Observação de MSOME de esperma:

Células de esperma foram examinadas a 21°C por um microscópio invertido (Olympus IX 70), equipado com Óptica Nomarski, uma lente Uplan Apo X 100/1,35 objetiva, e uma lente de condensador 0,55 NA. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo colorida DXC-950P (Sony), que tem uma potência HAD CCD de 3 chips, de 1,27 cm contendo por volta de 380.000 elementos efetivos (pixéis) para produção de imagem de alta qualidade, e um monitor de vídeo colorido (Sony PVM-14M4E, HR-Trinitron). A avaliação morfológica foi conduzida sobre a tela do monitor que, sob a configuração acima, alcançou uma amplitude real de 6300. Cem espermatozóides móveis de cada amostra de esperma foram examinados para o estado morfológico de 6 organelas subcelulares, lâmina pós-acrossomal, pescoço, mitocôndria, cauda e núcleo. As 5 primeiras destas organelas subcelulares foram consideradas morfolologicamente normais ou anormais na base da presença de malformações específicas, que foram definidas como descrito em Bartoov et al., 1981; Glezerman e Bartoov, 1993. Para o núcleo, o estado morfológico foi definido por tanto a forma como teor de cromatina. O critério para o núcleo normalmente conformado por MSOME são configurações lisas, simétricas e ovais. A faixa normal de comprimento e largura do núcleo do esperma foi tomada como $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ e $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$, respectivamente (desvio padrão \pm médio) enquanto células de esperma fora desta faixa foram consideradas anormais. A massa de cromatina no nuclear é homogênea, com nenhum distúrbio nuclear regional e contendo não mais do que um veículo com diâmetros de limítrofes de $0,78 \pm 0,18 \mu\text{m}$ a partir da visão frontal. Para ser considerado morfolologicamente normal, um núcleo de esperma deve ter tanto forma normal como teor de cromatina normal. Uma célula de esperma demonstrando um núcleo normal bem como um acrossoma normal, lâmina pós-acrossomal, pescoço, cauda, mitocôndria e nenhuma gotícula de citoplasma ou citoplasma em torno da cabeça foi classificada

como morfológicamente normal.

Teste da estrutura de cromatina no esperma (SCSA):

O SCSA determina a porcentagem de espermatozóides com estrutura de cromatina anormal. Estrutura de cromatina anormal foi definida como suscetibilidade aumentada de DNA de esperma a desnaturação induzida por ácido *in situ*. As quantidades de desnaturação de DNA por célula foram determinadas por citometria de fluxo que mediu o deslocamento de fluorescência verde (DNA nativo) para vermelho (DNA desnaturado, de filamento único) em núcleos coloridos com acridina laranja. Este deslocamento é expressado como o DFI (Índice de Fragmentação de DNA), que está na faixa de vermelho para intensidade de fluorescência total (vermelho + verde), representando a quantidade de DNA de filamento único desnaturado sobre o DNA celular total. No SCSA, DFI foi calculado para cada espermatozóide em uma amostra, e os resultados foram expressados como a média de 5000 células de esperma. Aliquotas de 100 µl de suspensão de células de esperma foram misturadas com 2 ml de solução de tampão TNE (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, pH 7,4) e centrifugadas a 400 x g_{max} durante 15 minutos a 25°C. O grânulo final foi recolocado em suspensão em 2 ml de tampão TNE. A suspensão foi centrifugada a 3000 x g_{max} durante 15 minutos a 4°C. O grânulo de núcleos obtidos foi fixado por pipetagem vigorosa em uma solução de fixação de 500 µl (acetona: 70% de etanol, 1:1^{v/v}). Todas as etapas do procedimento acima foram realizadas a 4°C. A amostra foi centrifugada a 3000 x g_{max} durante 15 minutos em temperatura ambiente e o grânulo foi misturado com 100 µl de solução de ácido-detergente (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, 0,01% de Triton X-100, pH 1,2), durante 30 s a 4°C. Então, a amostra foi colorida adicionando 5 µl de solução de coloração acridina laranja (AO) contendo 6 mg/ml de AO. A amostra foi diluída com 500 µl de tampão cítrico (ácido cítrico, 0,037 M, Na₂HPO₄ 0,126 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, pH 6,0). Posteriormente, a amostra foi

submetida a citometria de fluxo em um citômetro de fluxo Becton-Dickenson FACSsort, San Francisco, CA, USA equipado com um laser ultrasense um laser de íon argônio de 15 mW com um comprimento de onda de excitação de 488 nm. A relação de DFI foi calculada como um pacote de software de 1.1
5 relação-tempo escrita por Jan van der Aa (Becton Dickenson, Erembodegem, Bélgica) e com software WinMDI 2.8. O Índice de Fragmentação de DNA (DFI) é a fluorescência média de células de esperma com fragmentação de DNA nuclear. A % de Índice de Fragmentação de DNA (% DFI) é a porcentagem de células de esperma com fragmentação de DNA nuclear. Este
10 parâmetro foi computado com base na distribuição de DFI.

Atividade de DNase no plasma intracelular e sanguíneo:

Células de esperma foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e foram então centrifugadas durante 10 min (27.000 g, 4°C). O plasma foi separado do sangue por centrifugação em tubos de
15 EDTA, 0,3ml de sobrenadante foi adicionado a 0,6 ml de tampão de atividade de DNase e a mistura foi medida em um espectrofotômetro a 260 nm contra uma referência que continha somente tampão e meio. Curvas de calibração foram feitas usando um DNase I bovino comercial. DNase interno de células de esperma foi medido em unidades Kunitz. Uma vez que a unidade Kunitz é definida como a
20 quantidade de DNase que produz um aumento de 1 O.D. por minuto a 260 nm em uma extensão de trajeto de 1 cm em pH 5 a 25°C, em um tampão de reação que contém MgSO₄ 5 mM x 7H₂O, acetato de Na 0,1 Mm pH 5 e 4 mg/% de DNA de timo de bezerro. DNase do plasma foi medido em unidades Bartoov. Uma unidade Bartoov (BU) é definida como a quantidade de enzima que produz um
25 ΔA_{260} de 0,001 por minuto em extensão de trajeto de 1 cm em 0H 7,5 a 25°C, em um tampão de reação que consiste de Tris 0,1 M, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 10 mM e 0,05 mg/ml de DNA de timo de bezerro.

Expressão do receptor Fas em células de esperma:

Células de esperma foram lavadas com PBS e incubadas em

4% de paraformaldeído (PFA) durante 30 min a 25°C. AS células foram então incubadas durante 15 min em solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) e então incubadas durante 40 min com anticorpos de receptor Fas anti-cabra. Anticorpo de receptor Fas anti-humano foi rotulado com FITC e nenhum
5 segundo anticorpo foi necessário. Quando células de esperma de camundongo foram usadas, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 30 min com um segundo anticorpo anti-cabra rotulado com FITC. As células foram lavadas e a fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo Becton-Dickensen FASCSort.

10 **Atividade de caspase-3 em células de esperma:**

A atividade de caspase-3 foi medida usando um kit calorimétrico obtido de R&D Company. As células de esperma foram lavadas com PBS, incubadas em tampão de lise durante 10 min a 4°C e centrifugadas durante 1 min a 10.000 g. 50 µl de tampão de reação e 5 µl de substrato
15 colorimétrico de caspase 3 foram adicionados a cada 50 µl de sobrenadante e incubados durante 2 h a 37°C. A atividade foi medida em um espectrofotômetro a 405 nm.

Separação de células de esperma expressando receptor Fas de células de esperma expressando receptor não Fas:

20 Células de esperma foram lavadas com PBS e incubadas durante 30 min com anticorpos de receptor Fas anti-cabra. O anticorpo de receptor Fas anti-humano foi rotulado com biotina e nenhum segundo anticorpo foi necessário. Quando se usou células de esperma de camundongo, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante mais 30 min com um
25 segundo anticorpo anti-cabra rotulado com FITC. As células então foram lavadas com PBS e incubadas durante 20 min tanto com anticorpo anti-biotina conjugado a micro contas contendo íons ferro (de Myltenyi biotech Company) para determinação da atividade caspas, ou anticorpo anti-FITC conjugado a estas microcontas para inseminação em camundongo. A separação de células

de esperma positivas e negativas do receptor Fas foi realizada como a seguir. As células foram lavadas com PBS e transferidas através de uma coluna de separação de MACS imuno-magnética de Myltenyi biotech Company. Células de esperma não rotuladas que não expressaram o receptor Fas fluíram
5 através da coluna sem ligação. As células de esperma que expressaram o receptor Fas foram ligadas à coluna e eluíram depois usando pressão de êmbolos.

Exame de DNase no plasma em camundongos após administração oral ou de injeção

10 Camundongos pretos C57 foram deixados em jejum durante 12 horas e então receberam tanto administração oral de PBS (placebo, n=10) como administração oral de 9 mg de DNase I em 200 µl de PBS (n=14), ou injeção intraperitoneal de 3 mg de DNase I em 200 µl de PBS (n=6). Camundongos de controle não foram tratados de todo (n=10). O sangue foi
15 coletado do coração do camundongo 40 min após injeção ou 1 h após administração oral. O plasma foi separado do sangue por centrifugação em tubos de EDTA e armazenado a -20°C. A atividade de DNase no plasma foi determinada em unidades Bartoov.

Resultados

Efeitos in vivo de DNA acelular

20 Como observado na figura 1, os níveis de DNA acelular endógena são elevados no sangue de homens subférteis comparados a homens férteis, indicando uma correlação entre nível de DNA alto no sangue e subfertilidade. Naturalmente, injeções intravenosas de DNA acelular em
25 camundongo macho prejudicaram seu potencial de fertilidade. Dois grupos de 10 camundongos machos receberam injeções intravenosas tanto de 200 µg de DNA acelular como PBS durante 15 dias. Os camundongos foram então acasalados com camundongas e o número da prole foi contado em ambos os grupos. A figura 2 mostra que i acasalamento com os camundongos de

controle deu proles de $6,9 \pm 1,7$ fêmea enquanto acasalamento com camundongos injetados com DNA deu proles de $0,7 \pm 2,2$ por fêmea. Além disso, injeção intravenosa de DNA acelular em camundongos prejudicou sua qualidade nuclear de células de esperma, como observado por uma redução na estabilidade de cromatina em células de esperma como expressado em um aumento no DFI (figura 3). Além disso, injeção intravenosa de DNA acelular em camundongos induziu ativação de marcadores apoptóticos no receptor Fas, caspas 3 e DNase dentro de suas células de esperma (figuras 4-6).

Injeção de DNA acelular afeta não somente as células de esperma mas também o tecido do testículo. Como observado nas figuras 7 e 10, DNA acelular causou o aparecimento de células gigantes e depleção do epitélio do túbulo por mudança do envoltório de células germinais maduras e não maduras testiculares no lúmen do túbulo. Injeção de DNA acelular também causou o aparecimento de grandes áreas apoptóticas (figuras 8-10). Espermatogênese nos testículos leva aproximadamente 64 dias em humanos. Assim, espera-se que o dano aos testículos causado por DNA tenha um impacto sobre o desenvolvimento de células de esperma durante um longo período de tempo e o reparo deste dado pode requerer tratamento prolongado.

Administração intramuscular de DNase I

A fim de examinar se DNase I pode melhorar a qualidade do sêmen e o potencial de fertilidade, ele foi administrado em homens subférteis. Em um grupo de 11 casais em que o homem foi previamente identificado como sendo subfértil e que falhou na concepção em um tratamento com IVF-ICSI, os homens receberam quatro vezes ao dia 25 mg de DNase I bovino por injeção intramuscular (IM) durante um período de 7-10 dias. 7-11 dias após a primeira injeção, os casais receberam um segundo tratamento com ICSI. Amostras de sêmen e sangue foram tomadas dos indivíduos duas vezes antes de começar o tratamento e 4-7 e 8-15 dias após a primeira injeção e analisadas. Como mostrado na figura 11, a análise do sêmen revelou que a

densidade do esperma aumentou em 70% após 8-15 dias de tratamento comparado às células ($24,28 \pm 14,73 \times 10^6$ /ejaculado de pré-tratamento versus células $14,31 \pm 10,15 \times 10^6$ /conjugado, respectivamente, $P < 0,08$). Além disso, um aumento de 60% na motilidade de esperma foi observado após 4-7 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($30,6 \pm 12,6\%$ versus $19 \pm 11,3\%$, respectivamente, $P < 0,033$, figura 12) e um aumento de 76% foi observado na motilidade progressiva de esperma após 8-15 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($47 \pm 33,1\%$ versus $26,7 \pm 23,4\%$, respectivamente, $P < 0,010$, figura 13).

10 A morfologia das células de esperma foi analisada de acordo com as guias de WHO (10). Após 8-15 dias de tratamento com DNase, a porcentagem de células de esperma morfológicamente conformadas no sêmen dos indivíduos foi elevada em 129% comparado a pré-tratamento ($19,9 \pm 12,1\%$ versus $8,7 \pm 15,6\%$, respectivamente, $P < 0,098$, figura 14). Além disso, foi mostrado que tratamento com DNase causou uma redução de 24% na porcentagem de defeitos de cabeça total após 8-15 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($57,3 \pm 17,6\%$ versus $77,3 \pm 13,4\%$, respectivamente, $P < 0,015$, fig. 15). Em particular, uma redução de 73% foi observada na porcentagem de cabeças amorfas após 8-15 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($9,4 \pm 7,3\%$ versus $34,5 \pm 29,3\%$ respectivamente, $P < 0,043$, fig. 16). Além disso, uma redução de 60% foi observada na porcentagem de defeitos de peças intermediárias após 8-15 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($5,4 \pm 5,1\%$ versus $13,5 \pm 8,6\%$, respectivamente, $P < 0,040$, fig. 17). A morfologia das células de esperma foi analisada também por MSOME em 3 indivíduos. Uma melhora em uma variedade de parâmetros de MSOME foi observada para estes indivíduos após o tratamento com DNase (tabela 1). Em particular, há uma melhora na porcentagem de células de esperma com núcleo normal.

Tabela 1

	Indivíduo nº. 1		Indivíduo nº. 2		Indivíduo nº. 3		Média	
	Antes do tratam.	Após 10 dias de tratam.	Antes do tratam.	Após 10 dias de tratam.	Antes do tratam.	Após 11 dias de tratam.	Antes do tratam.	Após tratam.
Células de esperma consideradas para análise MSOME (%)	90,7	94	95,3	98	83,4	90,7	89,8	94,2*
Células de esperma consideradas para análise MSOME (%)	93	6	4,7	2	16,65	9,3	10,2	5,8*
Células de esperma com núcleo normal (apropriadas para seleção de IMSI, primeira e segunda escolhas (%))	4	7,3	1,3	5,4	1,6	2,7	2,3	5,1*

*P <0,093

Dano de DNA em células de esperma está correlacionado com taxas de concepção prejudicadas bem como com a saúde da descendência.

5 Um dos métodos mais empregados para avaliar este dado é o “teste de estrutura de cromatina no esperma” (SCSA), que mede a estabilidade de cromatina no esperma em células expostas a meios ácidos. A fig. 18 mostra que o tratamento com DNase causou uma elevação na estabilidade de cromatina em células de esperma (valores %DFI menores) após 4-7 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($15,1 \pm 12,4\%$ versus $25 \pm 19,6\%$, respectivamente, P <0,033). Além disso, tratamento com DNase causou uma

10 redução na expressão do receptor Fas do marcador apoptótico em célula de esperma, tanto após 4-7 como 8-15 dias de tratamento, comparado a pré-tratamento ($26,5 \pm 12,5\%$ e $29,2 \pm 17,4\%$ versus $39,7 \pm 23\%$, respectivamente,

15 P <0,009 durante 4-7 dias e P <0,023 durante 8-15 dias, fig. 19).

Quatro mulheres de 11 casais (36%) tornaram-se grávidas após o segundo tratamento com ICSI que seguiu o tratamento com DNase. A taxa de gravidez média de um primeiro ciclo de ICSI no centro de IVF em que esta tentativa foi conduzida é de 25% [faixa de 18% a 32%]. A taxa de gravidez de

20 um segundo ciclo de ICSI de pacientes não tratados neste centro de IVF é desconhecida uma vez que após um ICSI não bem-sucedido, eles não realizaram um segundo ICSI mas ao contrário foram aconselhados sobre as falhas de ICSI de modo a usar inseminação de doador. Em qualquer caso, a

taxa de sucesso de 36% do segundo tratamento com ICSI está acima de 25% do centro de IVF, assim está claro que tratamento com DNase melhorou as chances de gravidez de tratamentos com ICSI.

Os resultados nas figuras 11 a 19 e tabela 1 mostram que a administração intramuscular de DNase I melhorou o sêmen na maioria dos parâmetros de qualidade de sêmen. A densidade do esperma foi melhorada em 70% ao término da experiência. A motilidade do esperma melhorou em 60% já após 4-7 dias de tratamento, mas uma redução na motilidade ocorreu mais tarde, possivelmente devido a uma resposta imune que se realiza em torno de dezessete dias e foi observada após uma febre de 24 h. A motilidade progressiva de esperma melhorou em 76% ao término da experiência. A elevação na motilidade do esperma e densidade do esperma melhorou o potencial de fertilidade dos indivíduos e permitiu aos que não puderam ser bem-sucedidos no primeiro tratamento com ICSI conceber em um segundo tratamento com ICSI e possivelmente também em outros tratamentos com ART como IVF clássico ou mesmo um tratamento com IUI.

Administração de DNase intramuscular também melhorou a morfologia do esperma como analisado de acordo com as guias de WHO (10). A porcentagem de células de esperma normais foi elevada em 129%. A porcentagem de células de esperma com defeitos na cabeça foi reduzida em 24% e levou a valor normal (≤ 65). A porcentagem de células de esperma com cabeças amorfas foi reduzida em 73% e a porcentagem de células de esperma com defeitos nos peças intermediárias foi reduzida em 60%. Uma melhora na morfologia do esperma foi observada também usando MSOME. O número de células de esperma considerado para análise de MSOME e o número de células de esperma com núcleo normal aumentou após tratamento. O número de células de esperma com vacúolos nucleares, o número de células de esperma de forma estreita e o número de células de esperma com distúrbio regional foi reduzido.

Além disso, o tratamento com DNase reduziu dano em células de

esperma. O dano de cromatina em células de esperma (como avaliado por SCSA) foi reduzido em 40% já após 4-7 dias de tratamento e a expressão do receptor Fas do marcador apoptótico foi reduzida em 26% após 4-7 dias e em 33% após 8-15 dias. Espera-se que a melhora na qualidade de sêmen observada após tratamento com DNase melhore o potencial de fertilidade e naturalmente um aumento na taxa de sucesso de tratamento com ICSI foi observado após tratamento.

Administração oral de DNase I

A fim de examinar se a administração oral de DNase I pode melhorar a qualidade do sêmen como observado com administração intramuscular, um grupo de 9 homens recebeu oralmente, quatro vezes ao dia, 50 mg de DNase I durante um período de 16 dias. Amostras de sêmen foram tomadas e analisadas dos indivíduos 5 dias após o início do tratamento, no dia do início do tratamento, e nos dias 5, 10 e 17 de tratamento. Como pode ser visto na tabela 2, a análise do sêmen revelou que a densidade do esperma (espermatozóides/ejaculado total) aumentou significativamente pós-tratamento comparado ao pré-tratamento ($103 \pm 50 \times 10^6$ células/ejaculado versus $42 \pm 38 \times 10^6$ células/ejaculado, respectivamente, $P < 0,05$). Quando os resultados foram expressados como % de controle, um aumento na densidade do esperma foi observado já 5 dias de tratamento e mais dramaticamente após 10 e 17 dias de tratamento ($235 \pm 95\%$, $160 \pm 72\%$ e $284 \pm 138\%$ versus 100% em controle, respectivamente, $P < 0,05$, fig. 20).

Tabela 2

Parâmetros de rotina	-5	0	5	10	17
Volume (ml)	1,2± 0,5	1,4± 0,6	1,8± 0,7	1,7± 0,8	2,3± 0,6**
Concentração ($\times 10^6$ células/ml)	31± 13	30± 12	42± 15	37± 12	45± 16*
Espermatozóides totais ($\times 10^6$ células/ej)	37± 30	42± 38	75± 46	63± 52	103± 50*
% de Motilidade do esperma	85± 22	52± 5	61± 21	72± 12	86± 33
% de viabilidade do esperma	76± 13	72± 11	71± 12	71± 12	77± 10
% de formas normais	15± 8	11± 5	17± 16	18± 10	15± 9
% de defeitos de cabeça	67± 10	70± 7	70± 16	72± 15	67± 9
% de defeitos de peça intermediária	6± 3	8± 4	6± 4	7± 2	6± 3
% de defeitos na cauda	15± 10	12± 12	8± 6	12± 8	12± 6

*p <0,05, n=9

** p <0,01, n=9

Além disso, um aumento no volume de sêmen foi observado após 17 dias de tratamento ($1,3 \pm 0,5$ ml pré-tratamento versus $2,3 \pm 0,6$ ml após 17 dias de tratamento, $P < 0,001$, tabela 2 e figura 21). Este aumento indica uma função aumentada das glândulas acessórias. Como mostrado na

5 tabela 2 e na figura. 22, a concentração de esperma também aumentou durante o tratamento.

Análise MSOME mostrou que a porcentagem de células de esperma tendo um núcleo normal aumentou 2 vezes já após 5 e 10 dias de tratamento comparado a níveis de pré-tratamento, como mostrado na tabela 3

10 e figura 23. Também houve um aumento no número de células de esperma com núcleo normal após 10 e 17 dias de tratamento comparado a pré-tratamento ($5,0 \pm 3,4 \times 10^6$ células e $5,7 \pm 5,1 \times 10^6$ células versus $1,6 \pm 2,1 \times 10^6$ células, respectivamente, $P < 0,05$, tabela 3 e figura 24). Além disso, um

15 decréscimo nas células de esperma com cabeças estreitas foi observado após 5, 10 e 17 dias de tratamento comparado ao controle ($84 \pm 15\%$, $85 \pm 15\%$ e $83 \pm 21\%$ versus 100% no controle, respectivamente, $P < 0,05$, figura 25).

Tabela 3

Parâmetros MSOME	-5	0	5	10	17
% de núcleo normal	$5,2 \pm 2,7$	$4,7 \pm 2,6$	$9,0 \pm 4,3^*$	$10,4 \pm 6,1^*$	$12,3 \pm 6,3^{**}$
Núcleo normal ($\times 10^6$ células)	$2,0 \pm 2,7$	$1,2 \pm 0,9$	$3,0 \pm 2,4$	$5,0 \pm 3,4^*$	$5,7 \pm 5,1^*$
Formas anormais totais	159 ± 31	154 ± 30	154 ± 30	150 ± 28	151 ± 30
% de Vacúolos nucleares	80 ± 13	79 ± 14	79 ± 12	73 ± 13	77 ± 10
% de formas pequenas	$0,1 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,8$	$0,4 \pm 1,2$	$0,1 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,6$
% de formas grandes	$3,3 \pm 2,3$	$4,4 \pm 2,3$	$3,9 \pm 2,1$	$2,2 \pm 1,4$	$2,5 \pm 2,3$
% de formas estreitas	40 ± 10	41 ± 14	33 ± 10	35 ± 9	34 ± 9
% de formas amplas	$4,2 \pm 3,0$	$3,2 \pm 2,4$	$3,5 \pm 2,0$	$5,2 \pm 4,0$	$2,9 \pm 2,0$
% de distúrbios regionais	31 ± 7	25 ± 11	34 ± 8	34 ± 9	34 ± 8
Índice de vacúolos	$1,8 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$

* $p < 0,05$, $n = 9$

** $p < 0,01$, $n=9$

20 Um aumento na estabilidade de cromatina nas células de esperma (valores DFI menores) foi observado já após 5 dias de tratamento comparado ao controle ($75 \pm 36\%$ versus 100% , respectivamente, $P < 0,05$, figura 26). Este aumento foi mais pronunciado após 10 e 17 dias ($65 \pm 31\%$ e

62± 33% versus 100%, respectivamente, P <0,005, figura 26). Além disso, a porcentagem de células de esperma expressando o receptor Fas do marcador apoptótico diminuiu após 10 dias de tratamento comparado a pré-tratamento (10,6 ± 7,5% versus 35,4± 26,4%, respectivamente, P <0,05, figura 27). Um
5 outro aumento foi observado após 17 dias de tratamento comparado a pré-tratamento (6,4± 5,2% versus 35,4 ± 26,4%, respectivamente, P <0,005, figura 27).

Dentre os indivíduos que participaram da experiência com DNase administrado oralmente, somente um indivíduo tentou com sua
10 parceira do sexo feminino completar com êxito a gravidez. Este casal tinha falhado anteriormente em quatro procedimentos com IUI. Após o tratamento com DNase, o casal alcançou com sucesso gravidez espontânea.

Os resultados nas figuras 20 a 27 e tabelas 2 e 3 mostram que administração oral de DNase I tem os seguintes efeitos:

- 15 1. Aumentar o volume de sêmen.
2. Aumentar a densidade e concentração de células de esperma.
3. Melhorar a qualidade de espermatozóides aumentando a fração de células de esperma tendo um núcleo normal, aumentando a
20 estabilidade de cromatina e diminuindo a proporção de células expressando o receptor Fas.

A fim de examinar se a administração de DNase por inalação leva a efeitos similares na qualidade do sêmen, ela foi examinada para um caso. No procedimento de inalação, o indivíduo inalou três vezes ao dia 8 mg
25 da enzima, tomados em intervalos de 4 horas. A inalação da enzima leva à elevação na porcentagem de núcleos anormais que foi mais profunda após 9 e 17 dias de inalação (figura 28).

Inibição de DNase em células de esperma endógenas

A fim de examinar se o citrato inibidor de DNase pode inibir

DNase em células de espermatozoides intracelulares, as células de espermatozoides foram incubadas com ou sem citrato 10 mM durante até 8 horas. A atividade de DNase intracelular foi medida de hora em hora e a soma da atividade de DNase foi calculada. A soma da atividade de DNase nas células de espermatozoides tratadas com citrato foi 43% das células de espermatozoides de controle (figura 29), indicando inibição de atividade de DNase intracelular por citrato.

A relação entre expressão do receptor Fas e atividade de caspas 3 em células de espermatozoides e fertilidade

Um dos marcadores de apoptose conhecidos é a expressão do receptor Fas. Como observado na figura 4, injeção de DNA acelular em camundongo leva a uma elevação estatisticamente significativa na expressão do receptor Fas sobre a membrana de suas células de espermatozoides. A incubação *in vitro* de células de espermatozoides com DNA acelular leva também à elevação significativa na expressão do receptor Fas sobre a membrana das células de espermatozoides (não mostrado). A fim de determinar se há uma correlação entre a expressão do receptor Fas e fertilidade masculina, a expressão do receptor Fas sobre a superfície de células de espermatozoides foi determinada em homens férteis e subférteis. A porcentagem de células de espermatozoides expressão o receptor Fas foi quatro vezes maior em subférteis do que em férteis ($78,8 \pm 27,4$ versus $12,7 \pm 6,4$, $P < 0,001$, figura 30). A seguir, a fim de examinar se existe uma correlação entre a expressão do receptor Fas em células de espermatozoides de homens subférteis e a atividade de caspase-3 no marcador apoptótico, as células de espermatozoides de homens subférteis foram separadas de acordo com sua expressão do receptor Fas. A atividade de caspase-3 foi determinada em cada população de células de espermatozoides. A porcentagem da atividade de caspase-3 nas células de espermatozoides positivas para receptor Fas foi 4 vezes maior do que a atividade de caspase-3 na sub-população negativa para receptor Fas ($207,2 \pm 39,6$ versus $47,2 \pm 10,5$, $P < 0,001$, figura 31).

A fim de determinar se a expressão do receptor Fas está

correlacionada com o potencial de fertilidade, a seguinte experiência foi conduzida: células de esperma de camundongo foram incubadas com DNA acelular (que verificou-se estimular a expressão do receptor Fas) e então células de esperma expressando o receptor Fas foram separadas de células não expressando o receptor Fas. Quatro grupos de 10 camundonga foram inseminados tanto com células de esperma que expressam receptor Fas (Fas+), células de esperma que não expressam receptor Fas (Fas-), células de esperma que foram incubadas com DNA acelular, mas não classificadas de acordo com a expressão do receptor Fas, e células de controle que não foram expostas a DNA. Todas as inseminações foram realizadas com o mesmo número de células de esperma. Como pode ser visto na figura 32, nenhum feto foi obtido da inseminação com células de esperma (Fas-) em contraste com células de esperma (Fas+) ou células de esperma de controle que produziram $3 \pm 1,4$ e $2,7 \pm 1,1$ fetos médios por camundonga, respectivamente. A inseminação com células que foram incubadas com DNA acelular mas não classificadas deram origem a somente $0,3 \pm 0,4$ fetos médios por fêmea.

A fim de determinar o estágio em que as células de esperma expressando receptor Fas falharam em produzir descendência, quatro grupos de camundongas foram inseminados com células de esperma como descrito acima. 16-2^o horas após inseminação, as fêmeas foram sacrificadas, oócitos foram tomados do oviduto e o número de 2 zigotos pró-núcleo (2PN) foi contado. Como mostrado na figura 33, as células de esperma Fas(+) e as Fas(-) deram origem a um número similar de zigotos 2PN e nenhuma diferença significativa foi observada entre células de esperma de controle e células de esperma que foram incubadas com DNA acelular. Então, um inseminação similar foi realizada usando células de esperma Fas(+) e Fas(-) e as camundongas foram sacrificadas em diferentes estágios da gravidez. O desenvolvimento embrionário foi examinado em ambos os tratamentos e comparado ao desenvolvimento embrionário em fertilização natural. Nenhum

desenvolvimento embrionário além do estágio de 2PN foi observado em fêmeas inseminadas com células de esperma Fas(+) enquanto fêmeas inseminadas com células de esperma Fas(-) demonstraram desenvolvimento embrionário normal como em fertilização natural (figura 34).

- 5 Além disso, a correlação entre a expressão do receptor Fas em células de esperma e o resultado de tratamento com IUI foi examinada em humanos. Amostras de sêmen de 72 casais subférteis que passaram por tratamento com IUI foram examinadas para expressão de Fas por coloração com imunofluorescência com receptor Fas anti-humano e análise FACS. 18
- 10 casos resultaram em gravidez enquanto os 54 casos restantes não resultaram em gravidez. Como mostrado na figura 35, a frequência de células de esperma Fas(+) no grupo que obteve gravidez ($22,4 \pm 18,2$ versus $33,1\% \pm 16,6$, respectivamente, $P < 0,027$).

Atividade de DNase no plasma sanguíneo da camundongo

- 15 A fim de examinar a capacidade de DNase alcançar a corrente sanguínea quando de administração oral, os camundongos foram tratados com DNase tanto por injeção intraperitoneal como administração oral e a atividade de DNase foi examinada após 1 hora. Como mostrado na figura 36, um aumento significativo na atividade de DNase no plasma sanguíneo foi
- 20 observada tanto nos grupos injetados peritonealmente como administrados oralmente em comparação com o grupo de controle negativo (14399 ± 4000 e 10853 ± 2150 , respectivamente, versus 1345 ± 580 , $p < 0,001$). Um pequena elevação na atividade de DNase também foi observada no grupo que recebeu placebo (4055 ± 3500).

Estudo em animal examinando a segurança e eficácia de DNase

25 Um estudo em animais examinando a segurança e eficácia de DNase em roedores e cachorros foi realizado no Federal Institute of Toxicology in Russia. O estudo mostrou que a administração aguda e prolongada de DNase não tem um efeito tóxico sobre os animais de

laboratório de sangue quente estudados. A administração de DNase diariamente, prolongada (30 dias), nos animais experimentais em doses que foram acima de 100 vezes maiores do que a dose recomendada para humanos não produziu efeitos prejudiciais detectáveis sobre os principais sistemas do corpo (nervoso, cardiovascular, hemopoiético, secretório, respiratório), metabolismo, condição de saúde geral, desenvolvimento e parâmetros homeostáticos básicos do organismo. A ausência de efeitos irritantes no sistema digestivo quando da administração de DNase também foi observada.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender uma enzima que degrada DNA e um carreador fisiologicamente aceitável.

5 2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a enzima é uma deoxirribonuclease (DNase) selecionada dentre endodeoxirribonuclease ou exodeoxirribonuclease.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a DNase é DNase.

10 4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a enzima é de origem animal, vegetal, bacteriana, viral, de levedura ou de protozoário ou é uma enzima recombinante ou uma enzima recombinante humana.

15 5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de estar na forma apropriada para administração oral.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de estar em uma forma de dosagem apropriada para administração por inalação.

20 7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de estar em uma forma de dosagem apropriada para administração por injeção.

25 8. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender uma substância que bloqueia a interação entre receptores de superfície de DNA acelular e os de superfície de células de espermatozoides e um carreador fisiologicamente aceitável.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a substância é glicoproteína IF-1.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação

8, caracterizada pelo fato de que o receptor é selecionado dentre CD4 e MHC II.

5 11. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender uma substância que liga a DNA e um carreador fisiologicamente aceitável.

12. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender uma substância que inibe Dnase de célula de esperma endógena e um carreador fisiologicamente aceitável.

10 13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a substância é selecionada dentre ácido aurintricarboxílico (ATA) ou ácido cítrico ou um sal do mesmo.

15 14. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender uma substância que inibe um membro de uma via de transdução de sinal mediada por ligação de DNA aos receptores de superfície de célula de esperma e um carreador fisiologicamente aceitável.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a substância é inibidor de caspase.

20 16. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizada pelo fato de compreender um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito antifertilidade de DNA acelular em células de esperma e um carreador fisiologicamente aceitável.

25 17. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma enzima que degrada DNA.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma deoxirribonuclease (Dnase) selecionada dentre endodeoxirribonuclease ou exodeoxirribonuclease.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a Dnase é Dnase I.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, caracterizado pelo fato de que a enzima é de origem animal, vegetal, bacteriana, viral, de levedura ou de protozoário ou é uma enzima recombinante ou uma enzima recombinante humana.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que a enzima é administrada oralmente.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que a enzima é administrada por inalação.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que a enzima é administrada por injeção.

24. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma substância que bloqueia a interação entre os receptores de superfície de DNA acelular e os de superfície das células de esperma.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a substância é glicoproteína IF-1.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o receptor é selecionado dentre CD4 e MHC II.

27. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma substância que liga DNA.

28. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma substância que inibe DNase de células de esperma endógenos.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o inibidor de Dnase é selecionado dentre ácido aurintricarboxílico (ATA) ou ácido cítrico ou um sal do mesmo.

30. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado

pelo fato de compreender a administração de uma substância que inibe um membro de uma via de transdução de sinal mediada por ligação de DNA a receptores de superfície de células de esperma.

5 31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a substância é um inibidor de caspase.

32. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender a administração de um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito antifertilidade de DNA acelular em células de esperma.

10 33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 32, caracterizado pelo fato de que a duração da administração é aguda, semi-crônica ou crônica.

34. Método para determinar um estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender:

15 (a) obter do indivíduo uma amostra de um tecido ou fluido corporal;

(b) medir na amostra um nível de DNA acelular ou um nível de um agente que causa uma redução no efeito do DNA acelular em células de esperma;

20 (c) comparar o nível medido em um ou mais valores de limiar predeterminados; e

(d) determinar o estado de fertilidade com base na comparação.

25 35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o agente é DNase.

36. Método para determinar um estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) obter do indivíduo uma amostra contendo células de esperma;

(b) medir nas células de esperma um nível de uma substância indicativa de apoptose;

(c) comparar o nível medido a um ou mais valores de limiar predeterminados; e

5 (d) determinar o estado de fertilidade com base na comparação.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a substância é selecionada dentre receptor Fas, caspas 3 e Dnase interno de célula de esperma.

10 38. Método para a reprodução assistida, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) obter uma amostra contendo células de esperma de um indivíduo do sexo masculino tratado pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 17 a 33;

15 (b) utilizar a amostra em uma técnica de reprodução assistida (ART).

39. Método para selecionar uma técnica de reprodução assistida (ART), caracterizado pelo fato de compreender:

20 (a) determinar um estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 34 a 37;

(b) determinar um ART com base no estado de fertilidade.

25 40. Método para selecionar células de esperma em uma população de células de esperma para uso em uma técnica de reprodução assistida, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) obter uma amostra de sêmen contendo células de esperma;

e

(b) remover da amostra de sêmen células de esperma que expressam um marcador apoptótico a fim de obter uma sub-população de

células de esperma.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o marcador é receptor Fas de superfície de células.

5 42. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o marcador é o receptor de superfície de células de esperma de DNA complexo.

10 43. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a etapa de remover células de esperma envolve a ligação do marcador por um anticorpo e a remoção da amostra de sêmen das células de esperma ligadas a anticorpo.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é rotulado fluorescentemente e as células de esperma ligadas aos anticorpos são removidas usando classificador de células ativadas por fluorescência.

15 45. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é capaz de ligar contas de resina e as células de esperma não ligadas são separadas das células de esperma ligadas por resina usando uma coluna ou centrifugação ou ímãs.

20 46. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a técnica de reprodução assistida é selecionada dentre inseminação intra-uterina, fertilização *in vitro*; injeção de esperma intra-citoplásmica e injeção selecionada morfológicamente intra-citoplasmática.

25 47. Composição farmacêutica para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender um agente selecionado dentre:

(a) um agente que causa redução em um efeito de DNA extracelular sobre células de esperma; e

(b) um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre

células de esperma;

junto com um carreador fisiologicamente aceitável.

48. Método para tratar subfertilidade masculina, caracterizado pelo fato de compreender administrar um agente selecionado dentre:

5 (a) um agente que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre células de esperma; e

(b) um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular sobre as células de esperma.

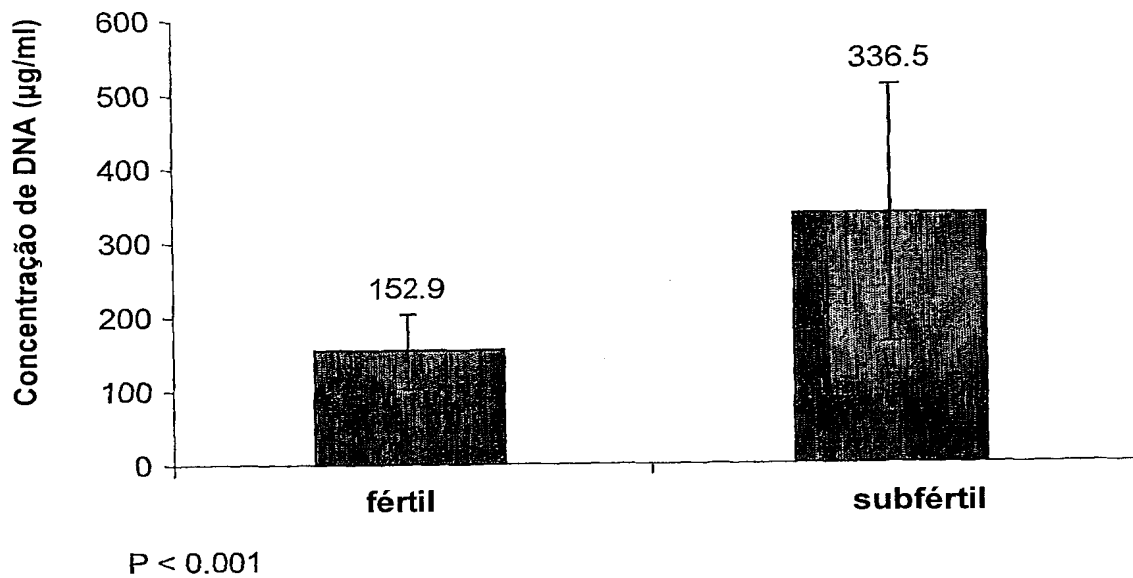


Fig. 1

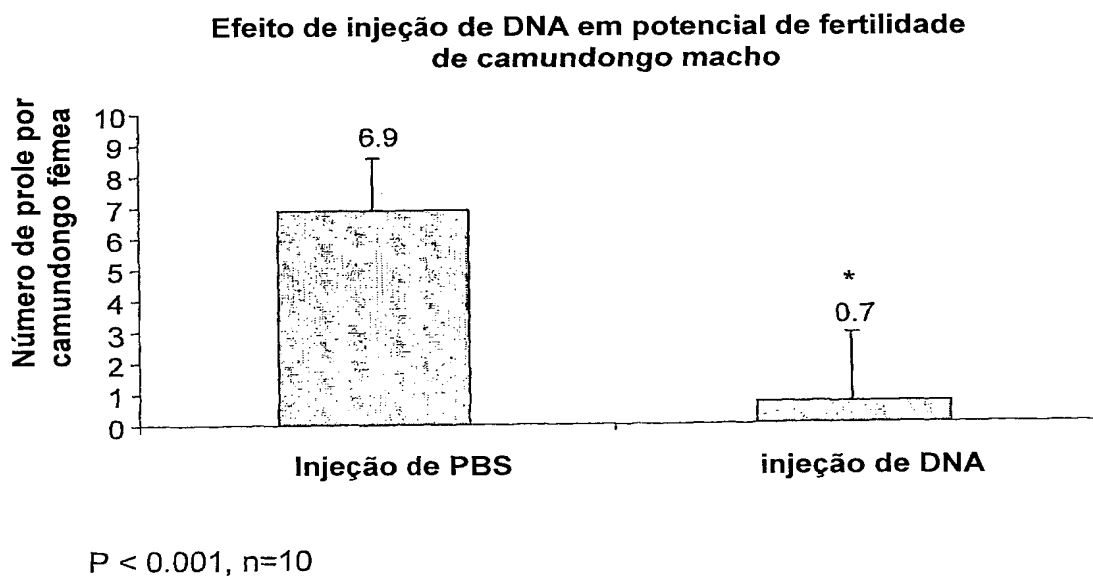
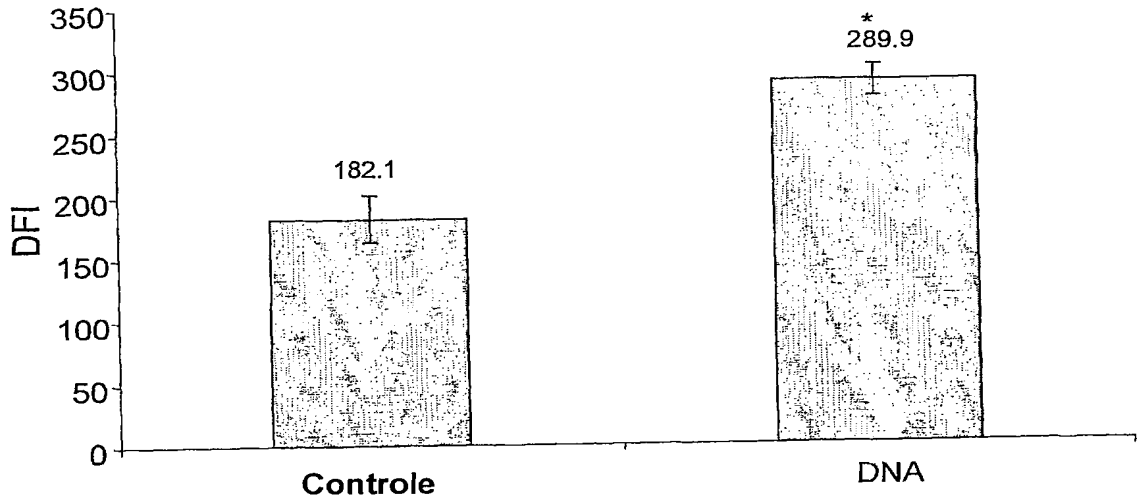


Fig. 2

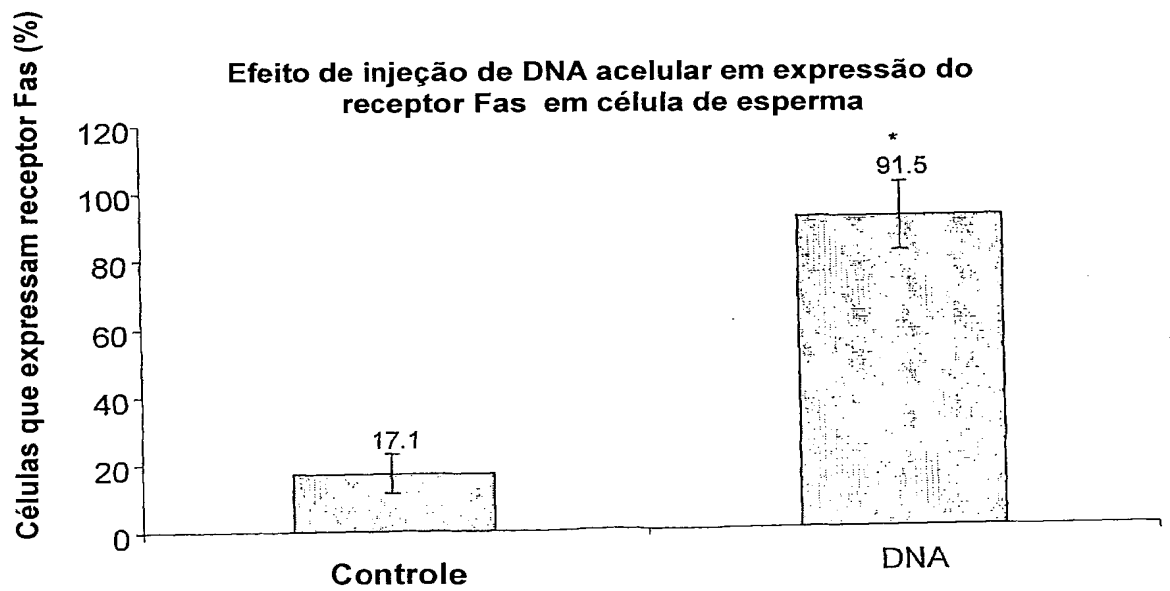
Efeito de injeção de DNA acelular em estabilidade de cromatina em célula de esperma



*P < 0.001, n=15

Fig. 3

Efeito de injeção de DNA acelular em expressão do receptor Fas em célula de esperma



*P < 0.001, n=15

Fig. 4

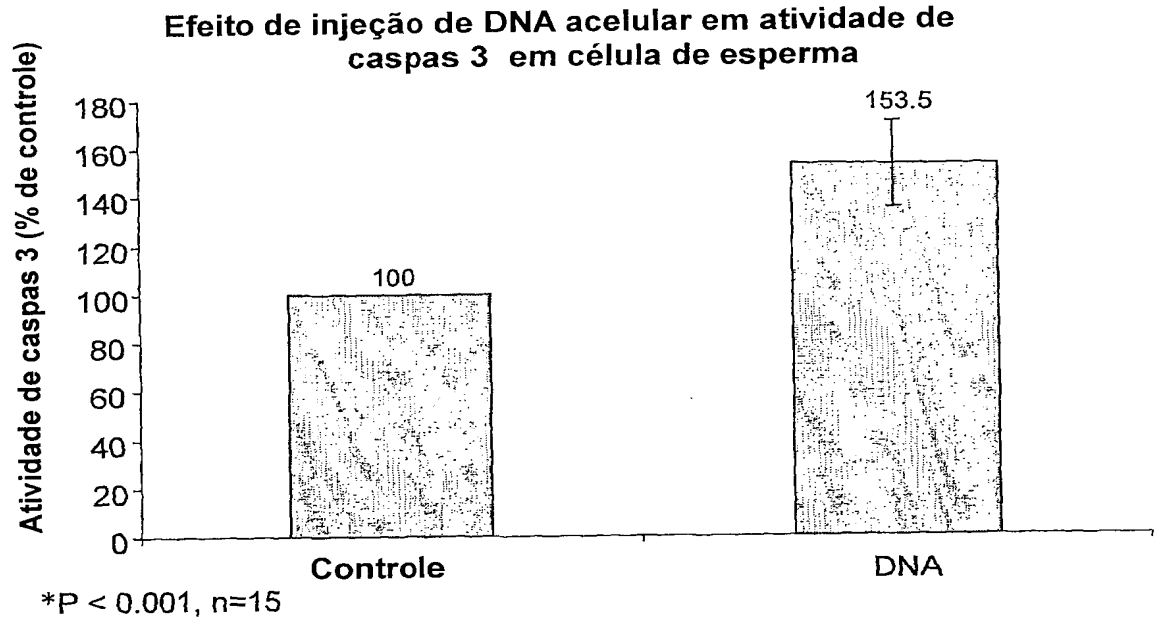


Fig. 5

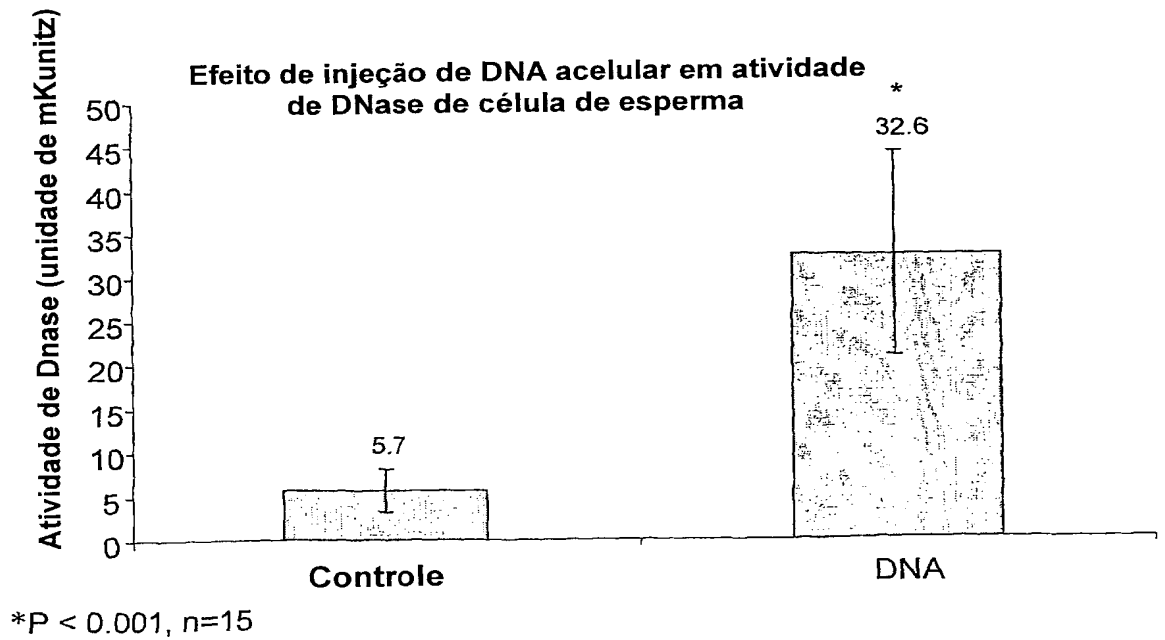


Fig. 6



Fig. 7

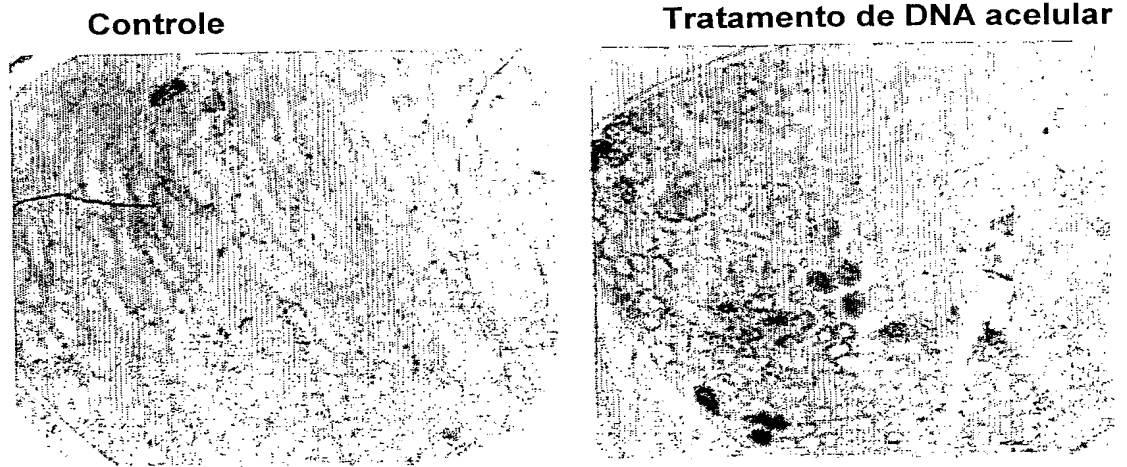
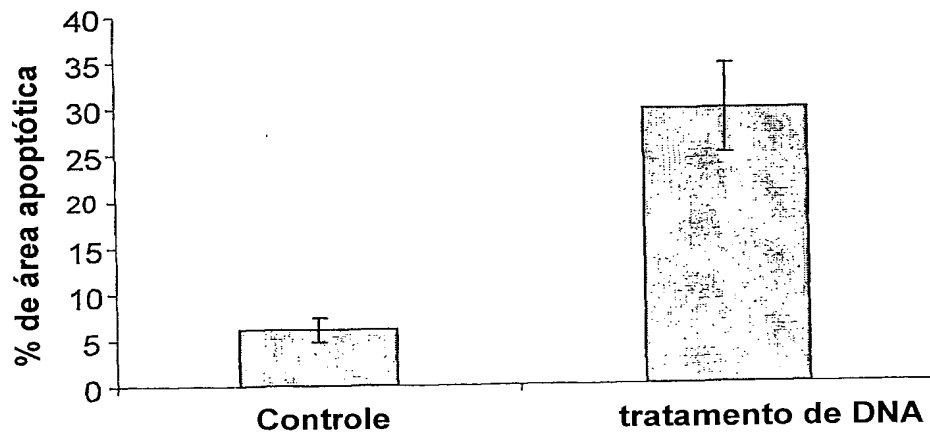


Fig. 8



P < 0.005, n=7

Fig. 9

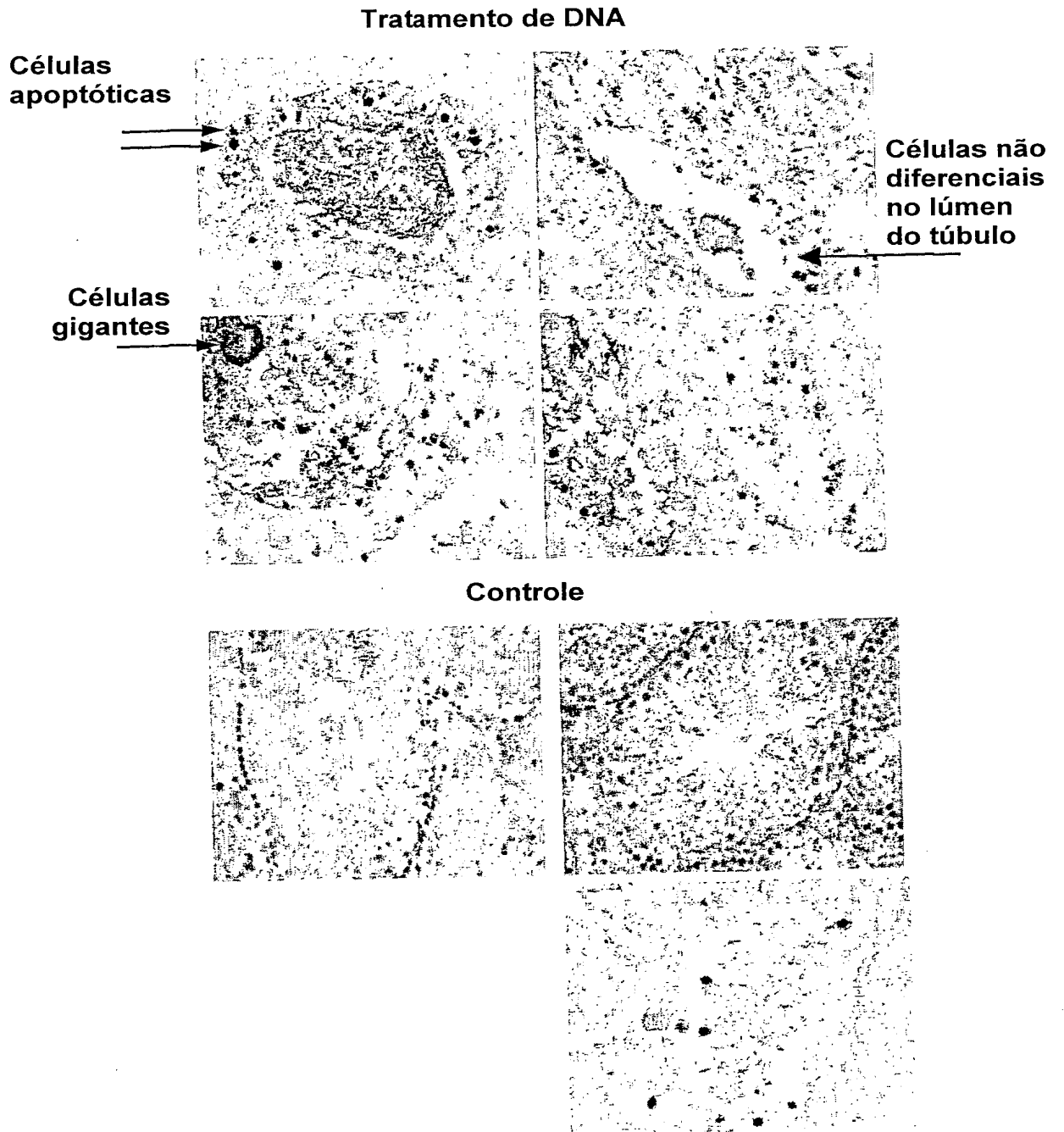
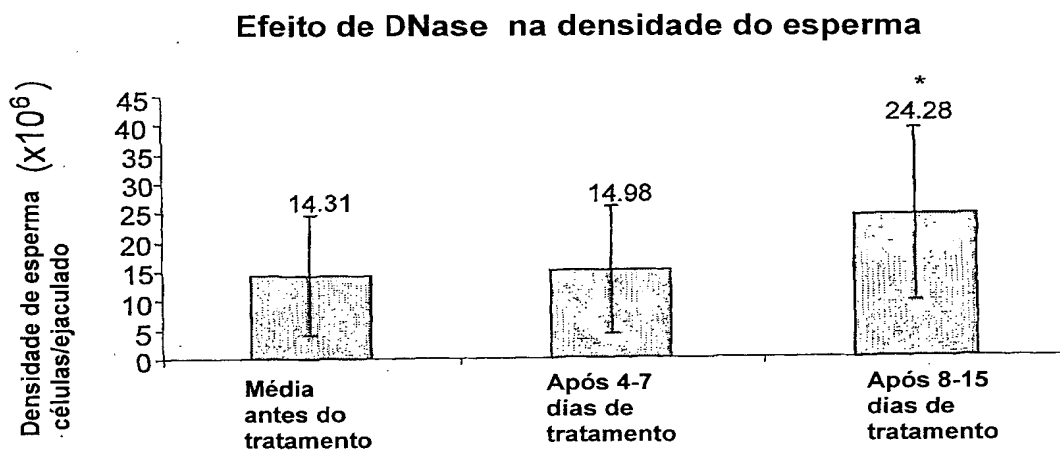


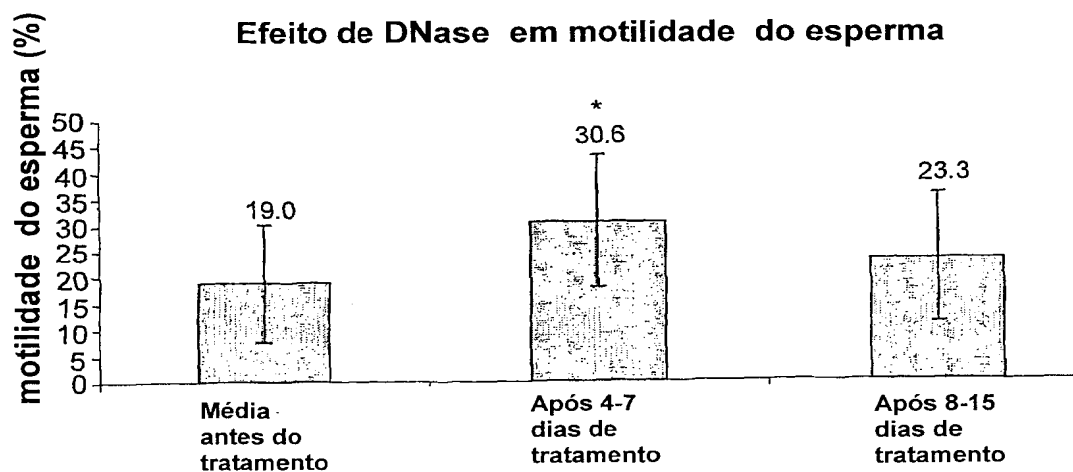
Fig. 10



*P = 0.079

Usando teste t emparelhado

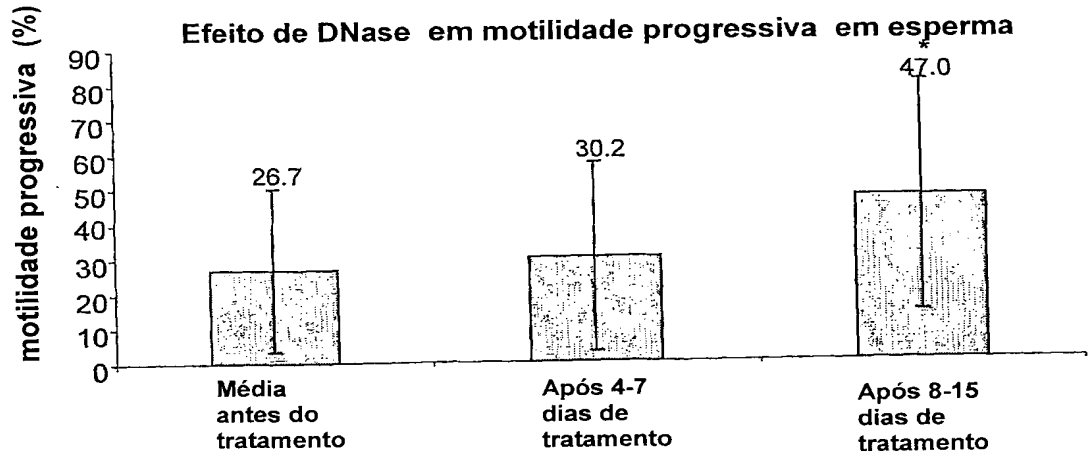
Fig. 11



*P = 0.032

Usando teste t emparelhado

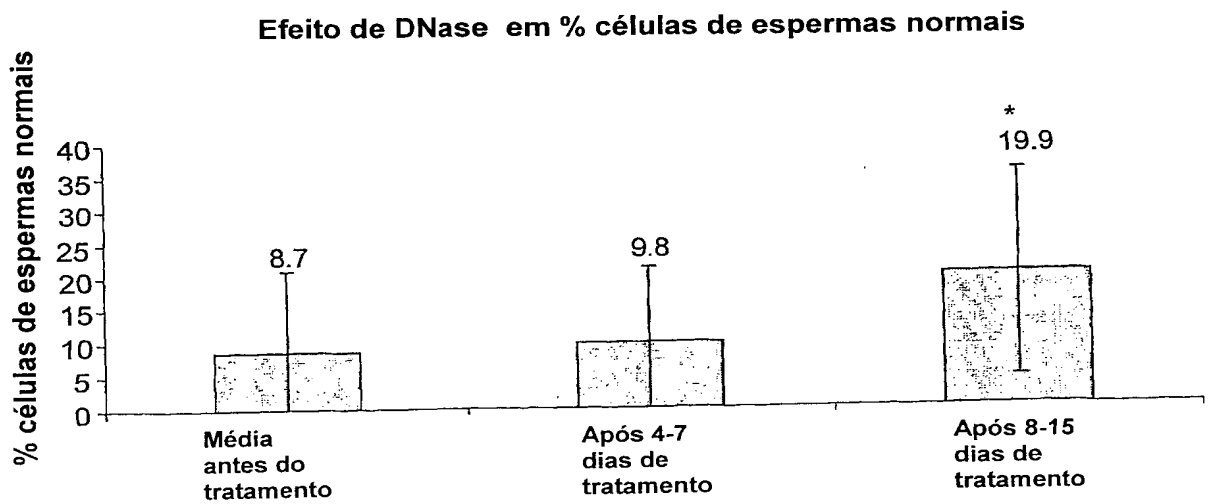
Fig. 12



*P = 0.01

Usando teste t emparelhado

Fig. 13

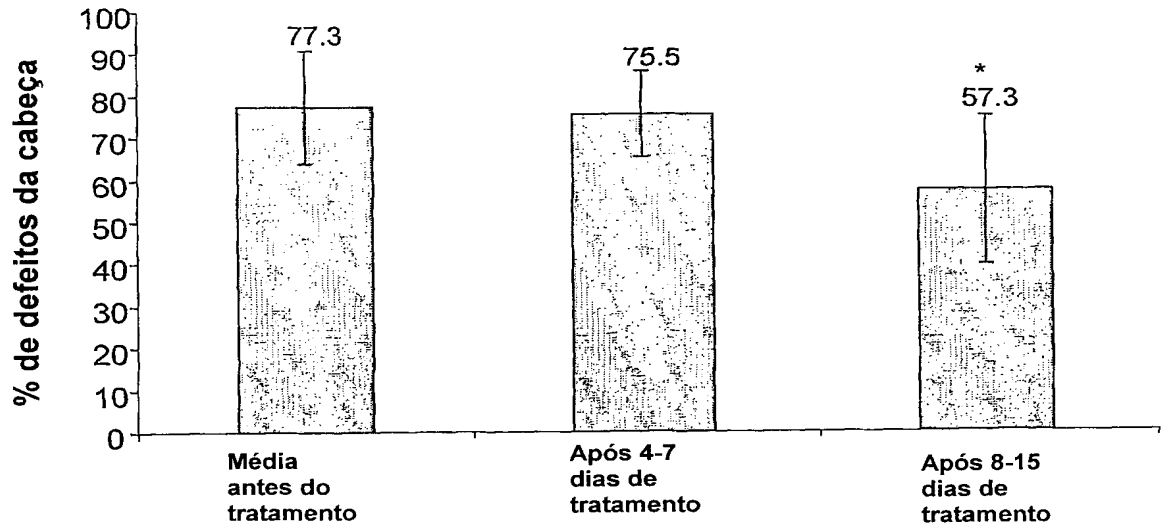


*P = 0.098

Usando teste t emparelhado

Fig. 14

Efeito de DNase em má formação de cabeça do espermatozói

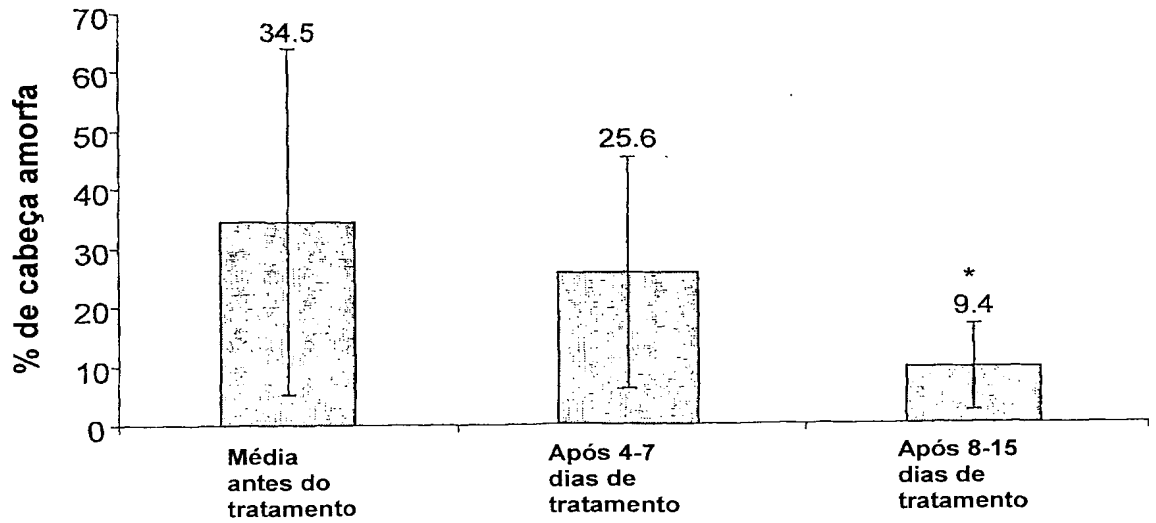


*P = 0.015

Usando teste t emparelhado

Fig. 15

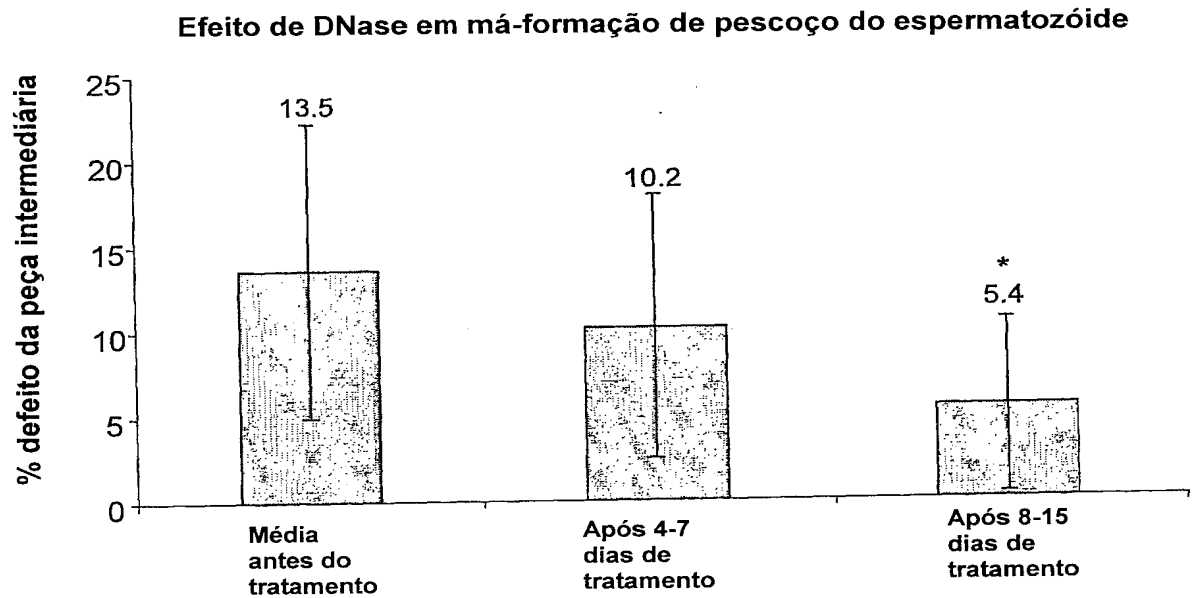
Efeito de DNase em má formação de cabeça do espermatozói



*P = 0.043

Usando teste t emparelhado

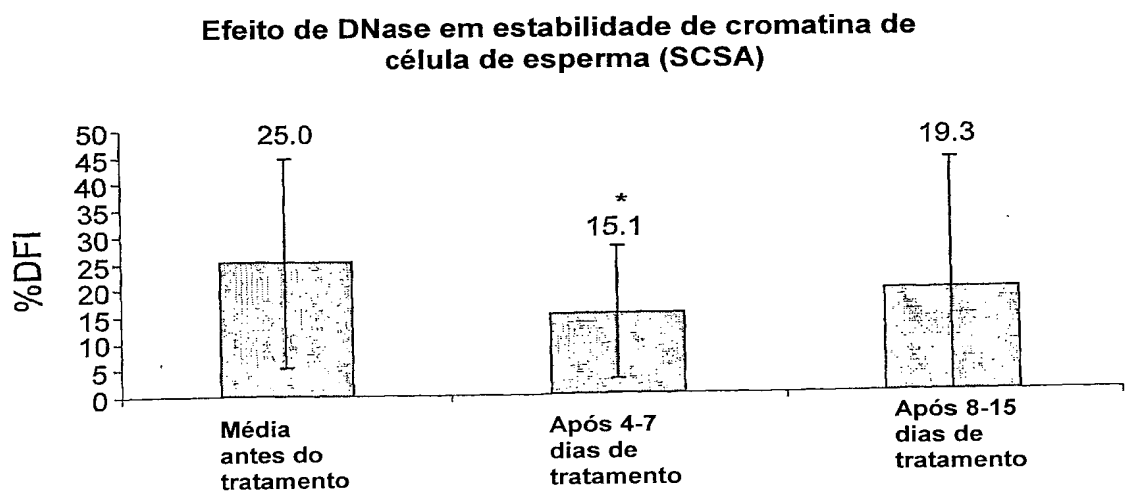
Fig. 16



*P = 0.040

Usando teste t emparelhado

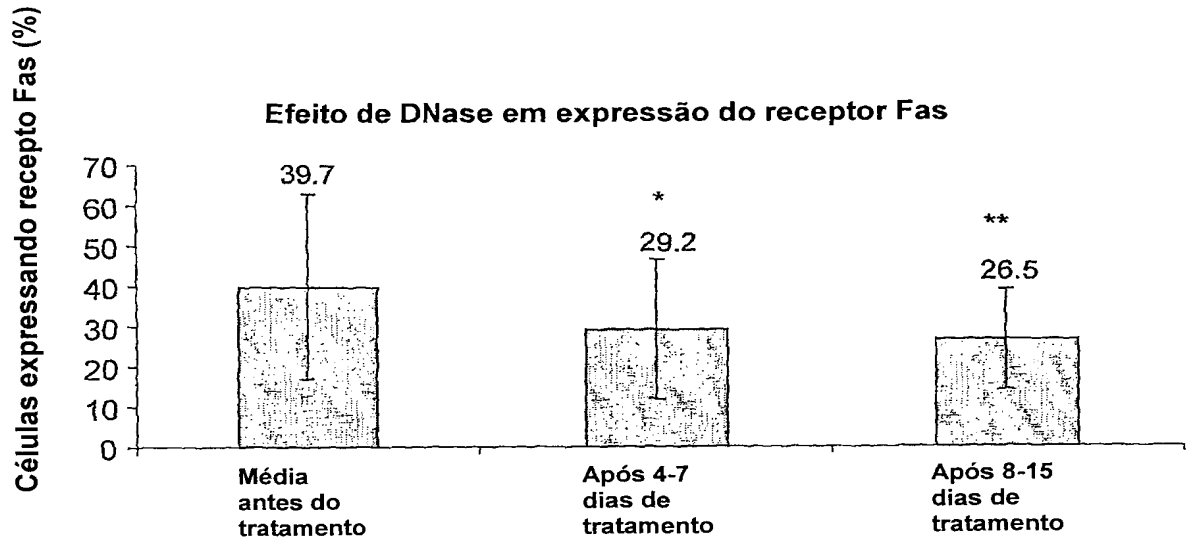
Fig. 17



*P = 0.032

Usando teste t emparelhado

Fig. 18

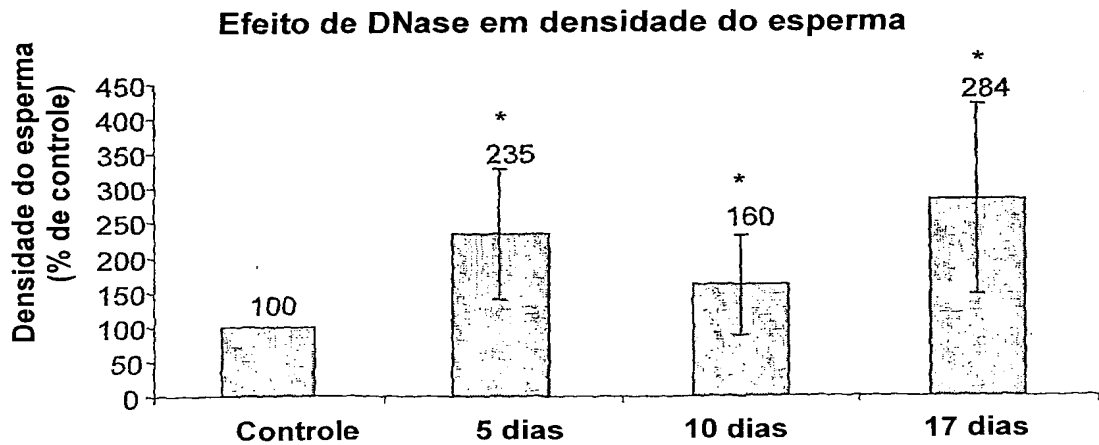


*P = 0.009

**P = 0.022

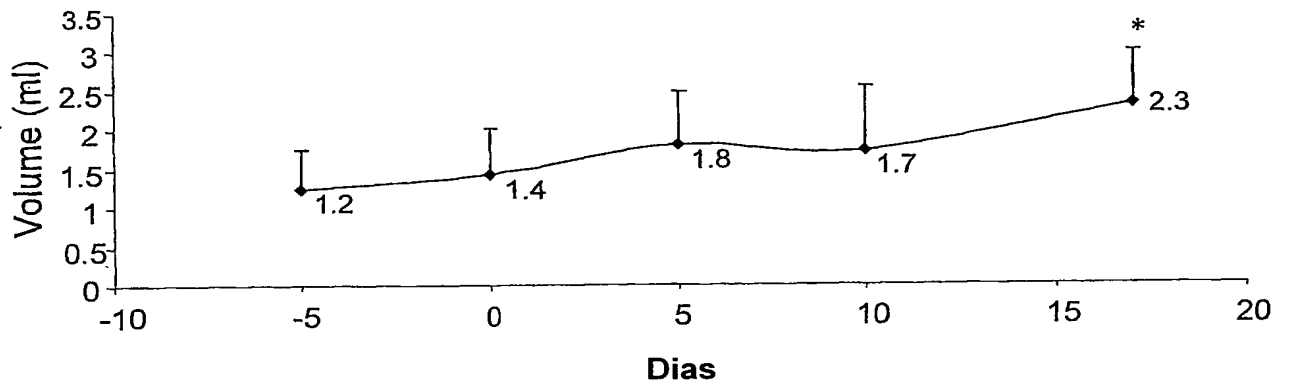
Usando teste t emparelhado

Fig. 19



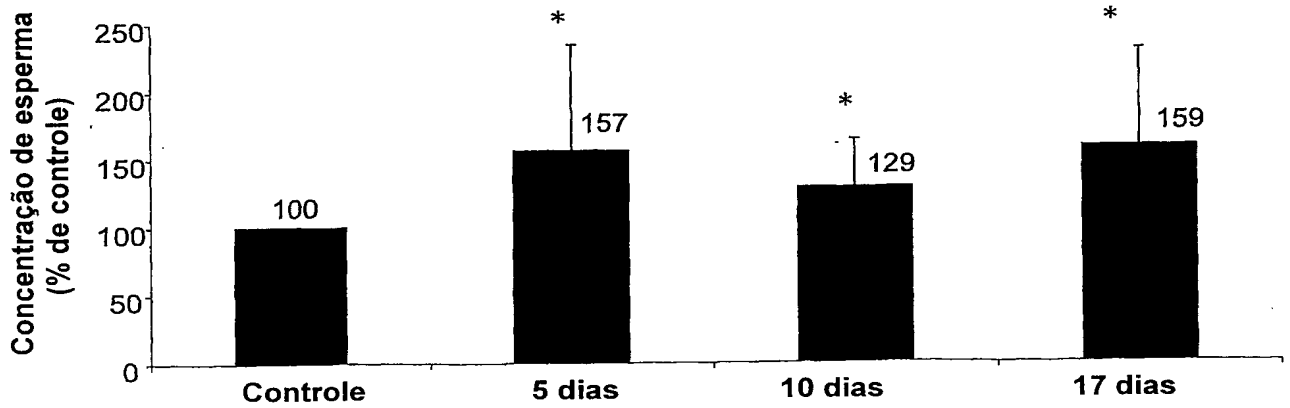
*P < 0.005, n=9

Fig. 20



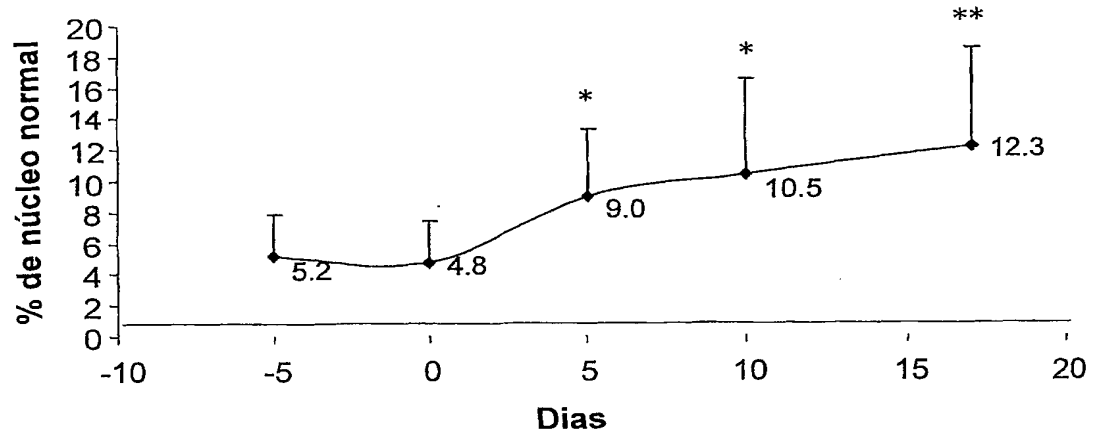
*P < 0.001, n=9

Fig. 21



*P < 0.05, n=9

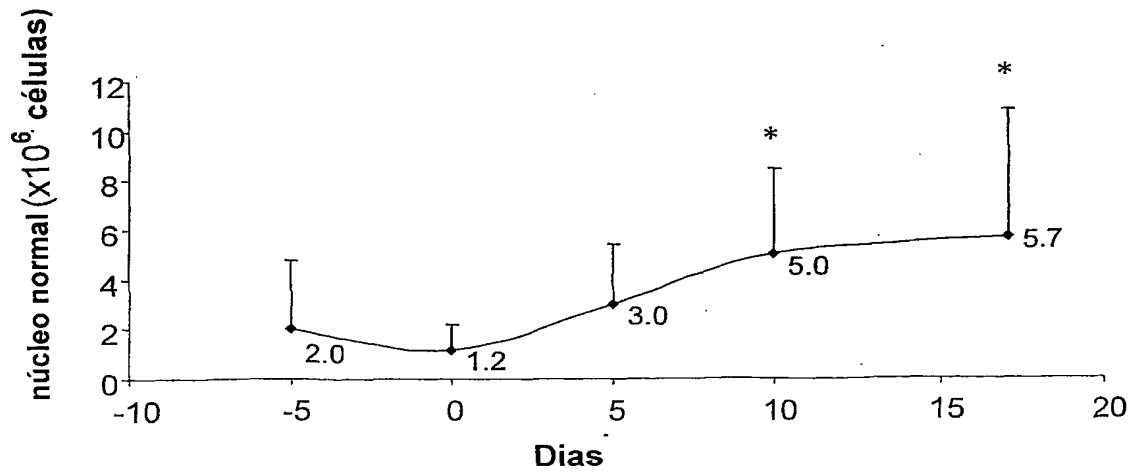
Fig. 22



*P <0.05, n=9

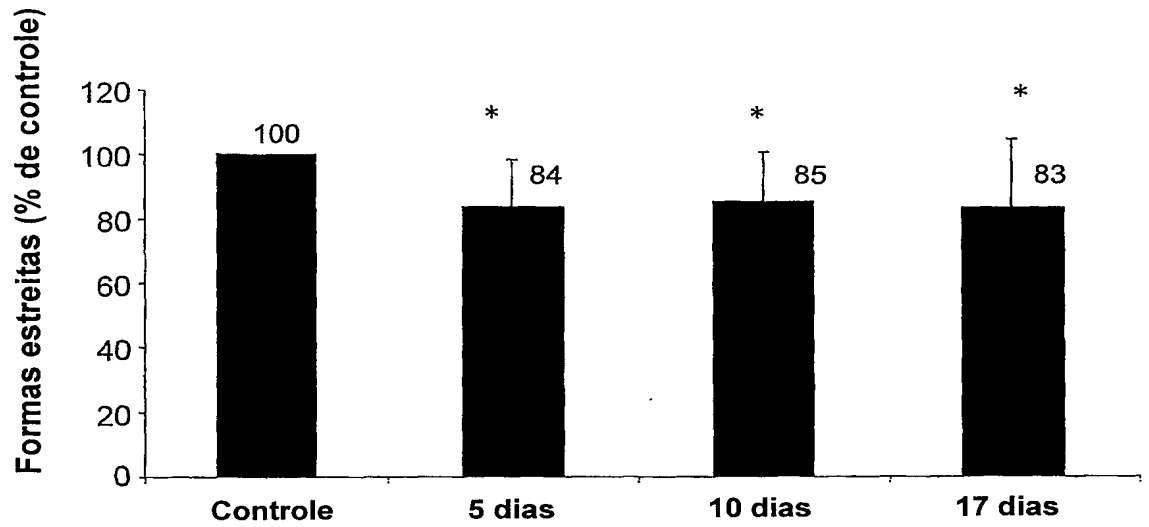
**P <0.005, n=9

Fig. 23



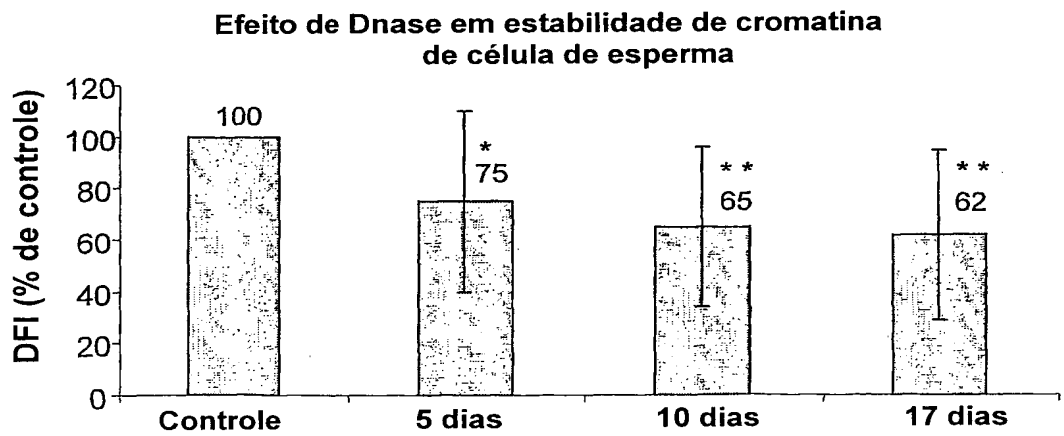
*P <0.05, n=9

Fig. 24



*P < 0.05, n=9

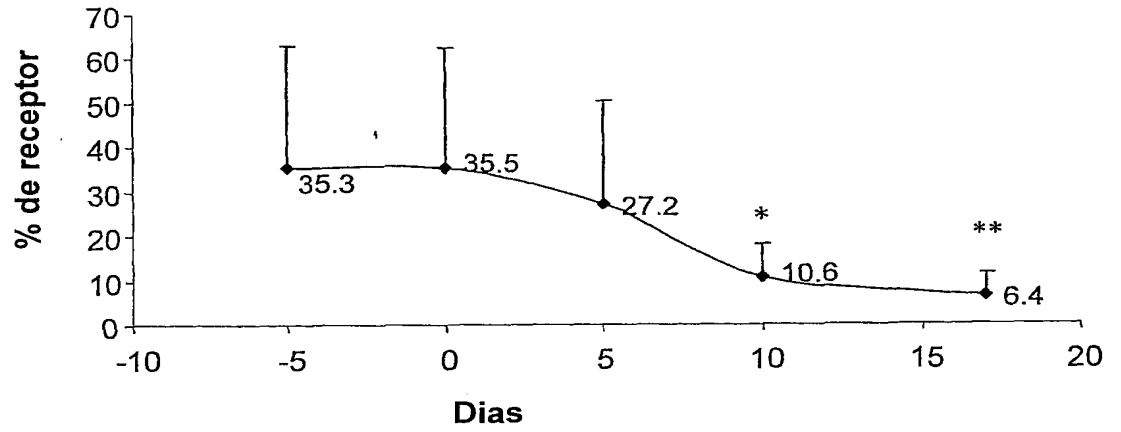
Fig. 25



*P < 0.05, n=9

**P < 0.005, n=9

Fig. 26



*P < 0.05, n=9

*P > 0.005, n=9

Fig. 27

Efeito de inalação de DNase em % de células de esperma com núcleo normal

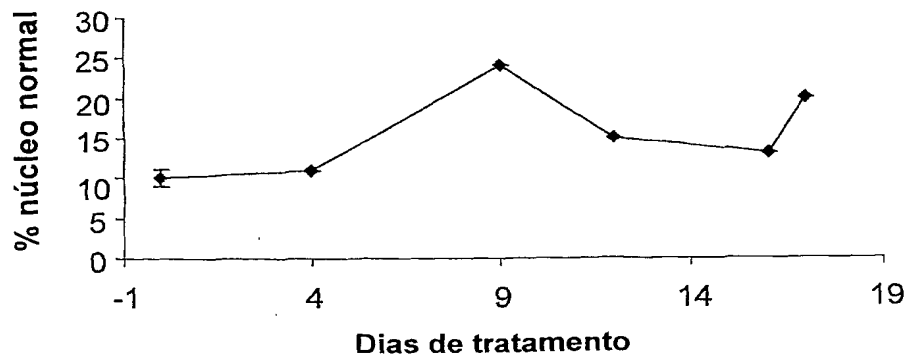


Fig. 28

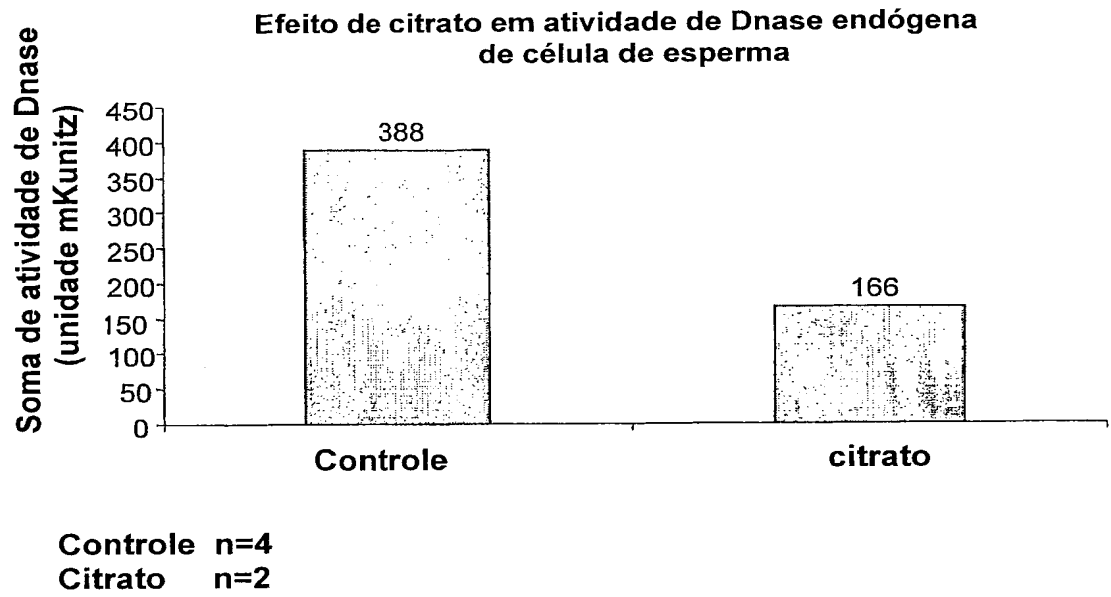
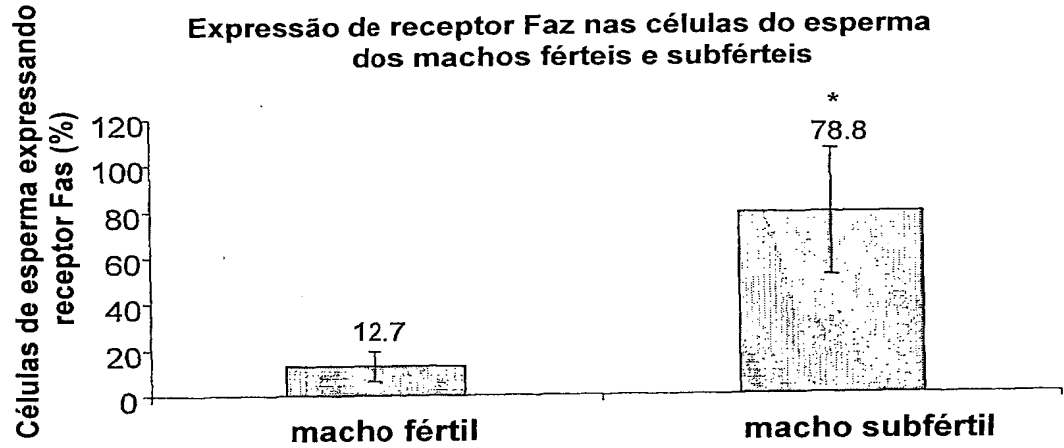
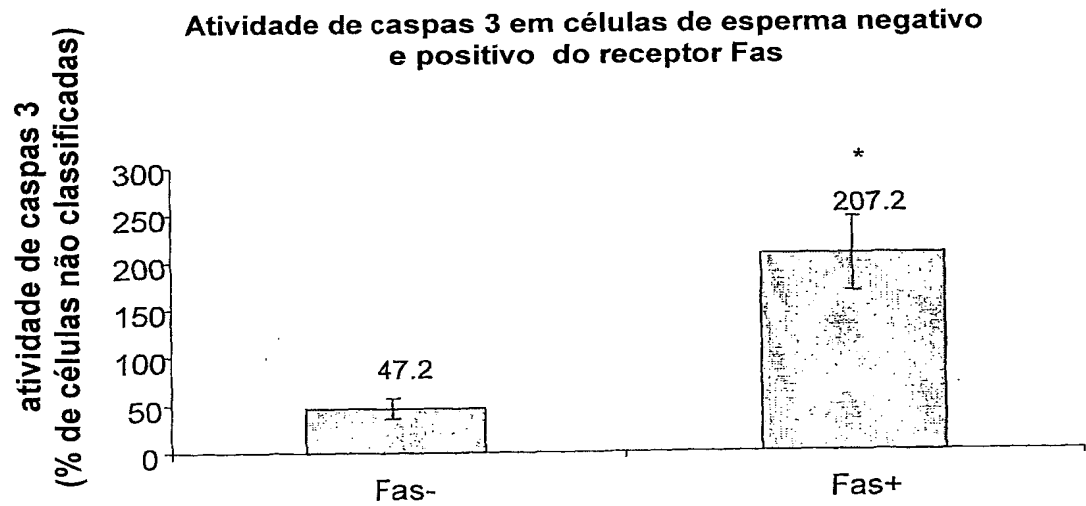


Fig. 29



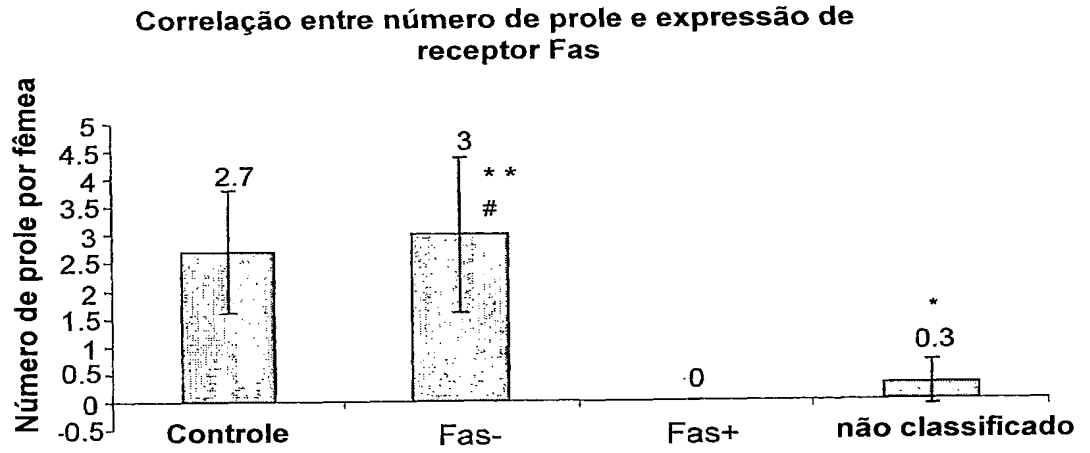
* $p < 0,01$, macho fértil $n=12$, macho subfértil $n=37$

Fig. 30



* $P < 0.001$, $n=8$

Fig. 31



P < 0.001 Comparada a células d esperma não classificados
 ** P < 0.001 Comparados com células de esperma Fas +
 * P < 0.001 Comparados com células de esperma de controle

Fig. 32

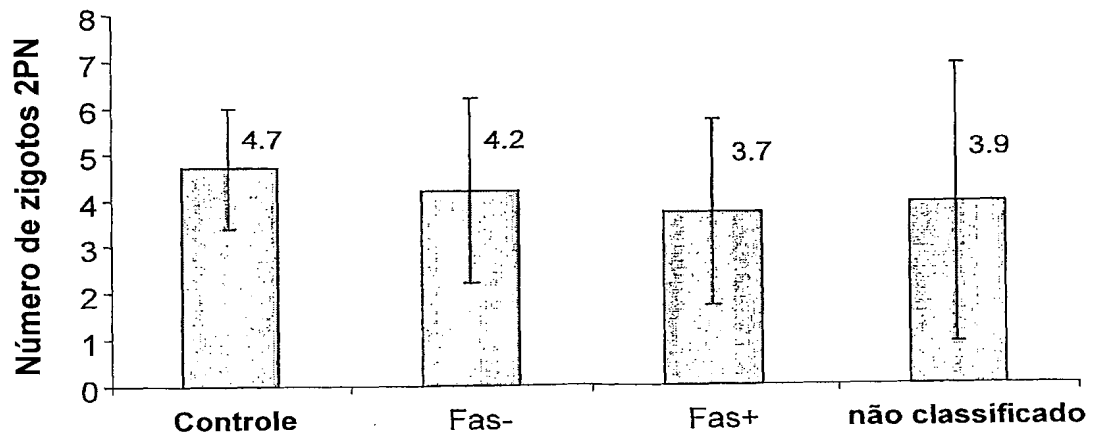


Fig. 33

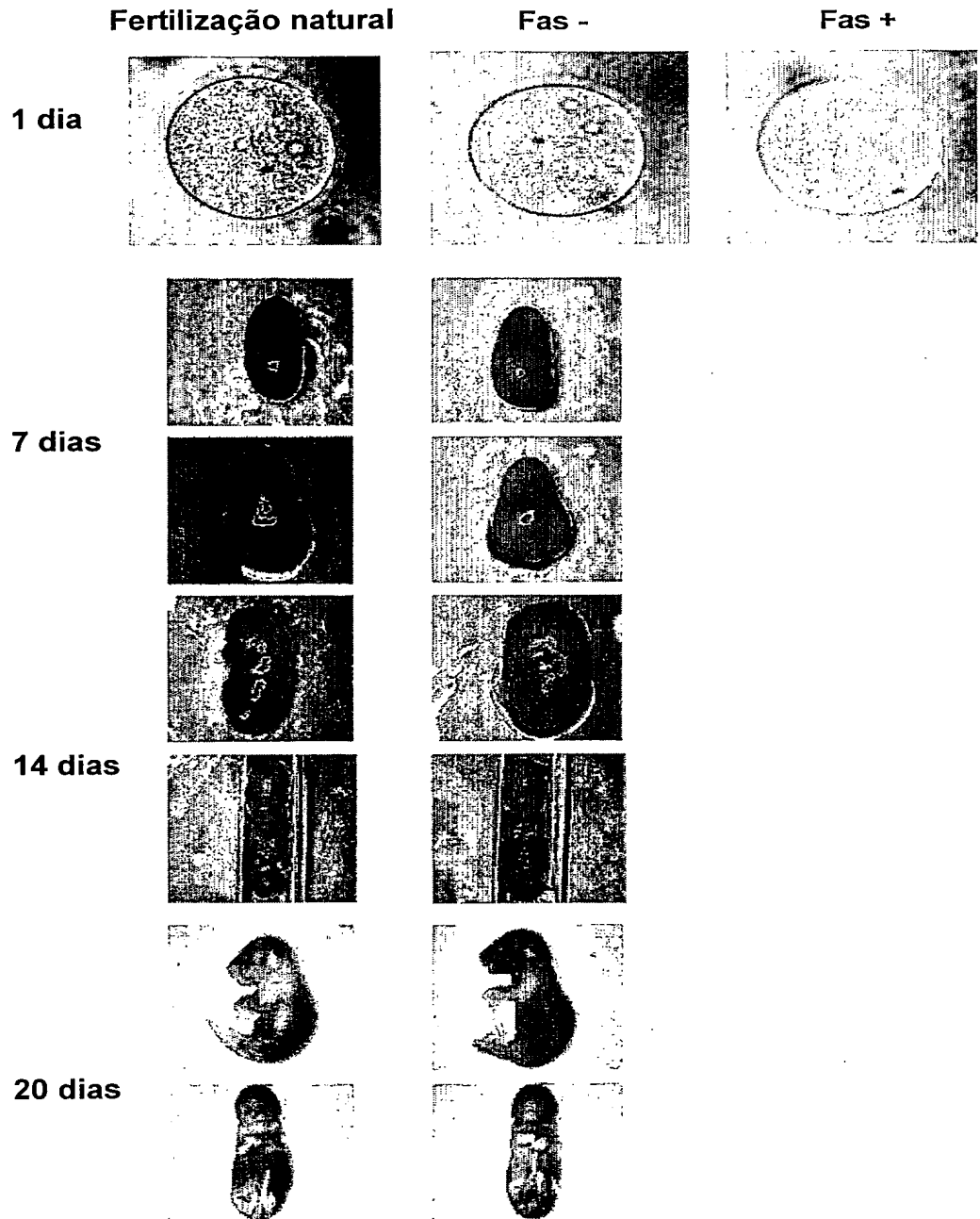
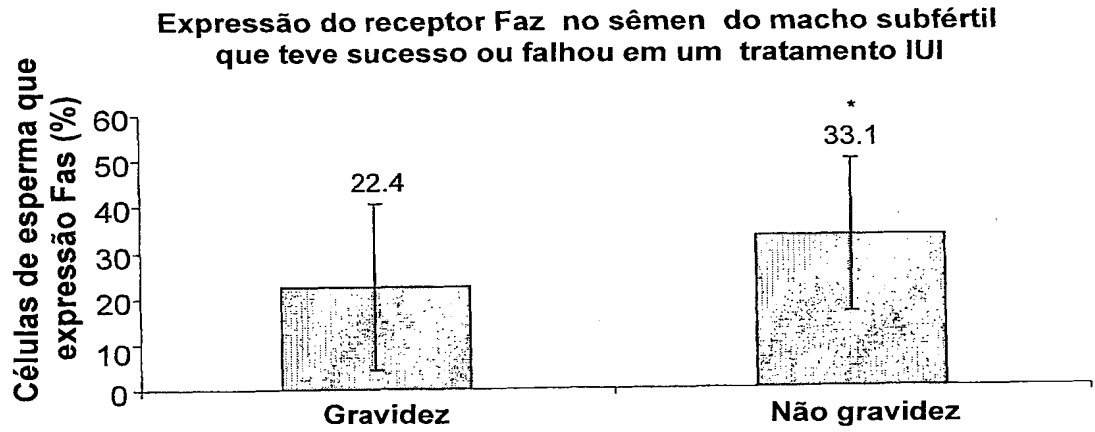
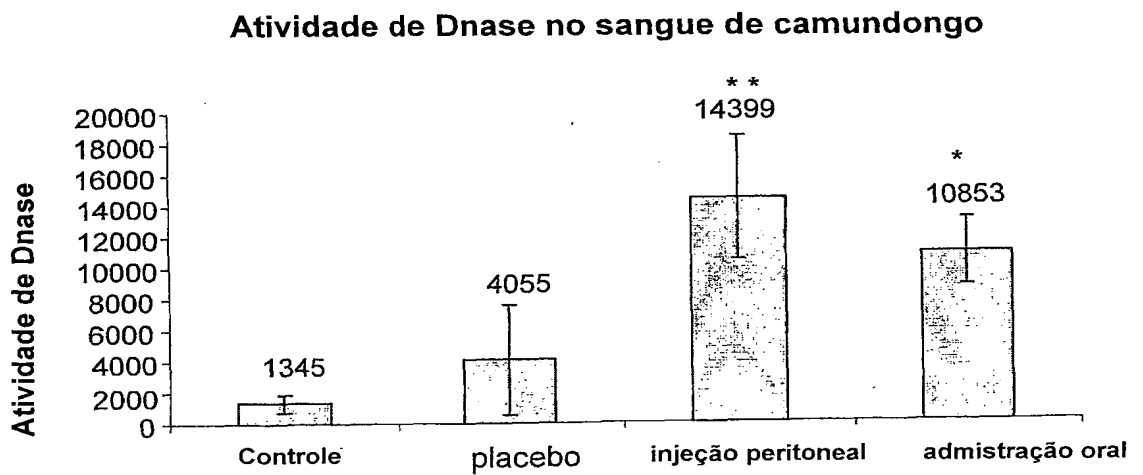


Fig. 34



*P < 0.027

Fig. 35



* P < 0.001 Comparado com controle, n=6

** P < 0.001 Comparado com controle e placebo, n=14

Fig. 36

RESUMO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, MÉTODOS PARA TRATAR SUBFERTILIDADE MASCULINA, PARA DETERMINAR UM ESTADO DE FERTILIDADE EM UM INDIVÍDUO DO SEXO MASCULINO, PARA A REPRODUÇÃO ASSISTIDA, PARA SELECIONAR UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E PARA SELECIONAR CÉLULAS DE ESPERMA EM UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DE ESPERMA PARA USO EM UMA TÉCNICA DE REPRODUÇÃO AUXILIADA”

A invenção provê composições farmacêuticas para tratar subfertilidade masculina incluindo um agente que causa uma redução em um efeito de DNA extracelular em células de esperma. O agente pode ser, por exemplo, uma enzima que degrada DNA como DNase, uma substância que bloqueia a interação entre os receptores de superfície de DNA acelular e os de superfície de células de esperma, uma substância que liga a DNA, uma substância que inibe DNase de células de esperma endógenas, uma substância que inibe um membro de uma via de transdução de sinal mediada por ligação de DNA receptores de superfície de células de esperma, ou um agente que estimula a produção de uma substância endógena que causa uma redução em um efeito antifertilidade de DNA acelular em células de esperma.

A invenção também provê métodos para tratar subfertilidade masculina compreendendo administrar uma composição farmacêutica da invenção. A invenção ainda provê métodos para determinar um estado de fertilidade em um indivíduo do sexo masculino, métodos para reprodução assistida, métodos para selecionar uma técnica de reprodução assistida (ART), e métodos para selecionar células de esperma em uma população de células de esperma para uso em uma técnica de reprodução assistida.