(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 524 458**

(51) Int. Cl.:

***A61K 38/48*** (2006.01)
***A61P 15/08*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007** **E 07827224 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2086642**

(54) Título: **DNasa para el tratamiento de la subfertilidad masculina**

(30) Prioridad:

**18.10.2006 US 852402 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**09.12.2014**

(73) Titular/es:

**PERINESS LTD. (100.0%)**
**RAMAT ILAN 1 ORANOM STREET**
**54052 GIVAT SHMUEL, IL**

(72) Inventor/es:

**BARTOOV, BENJAMIN;**
**YEHUDA, RONEN y**
**DOBROSLAV, MELAMED**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 524 458 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

DNasa para el tratamiento de la subfertilidad masculina

### Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas, y más específicamente a dichas composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de la subfertilidad masculina.

### Lista de referencias de la técnica anterior

A continuación se indica una lista de referencias de la técnica anterior que se considera que es pertinente para entender la invención. En el presente documento el reconocimiento de estas referencias se realizará a veces indicando entre paréntesis su número procedente de la siguiente lista.

1. Isidori A, Latini M, Romanelli F.(1) Isidori A, Latini M, Romanelli F. Treatment of male infertility. Contraception. Oct 2005; 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, Bosmans 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. 4 oct 2001; 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. Dic 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. mayo 2006; 12(5): 634-8.
10. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cuarta edición 1999. World Health Organization. Cambridge university press.
11. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. Int J Androl. feb 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. Ene-feb 2002; 23(1): 1-8.
13. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. Bioessays. Nov 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 de la invención

Actualmente, en el mundo occidental aproximadamente una pareja de cada cinco es subfértil. La subfertilidad se define como la imposibilidad de concebir después de 1 año de relaciones sexuales sin protección. La subfertilidad masculina se observa aproximadamente en la mitad de todas las parejas subfértiles y casi en el 40 % de dichas parejas la subfertilidad se debe exclusivamente a factores masculinos.

El estado de fertilidad masculina se evalúa mediante un análisis de semen (seminograma). El análisis más habitual, conocido como "*seminograma rutinario*", proporciona información sobre la cantidad de espermatozoides presentes en la eyaculación, la proporción de espermatozoides móviles (y/o progresivamente móviles) y el porcentaje de células que son morfológicamente normales. La subfertilidad masculina está normalmente asociada con uno o más de: producción baja de esperma (oligozoospermia), movilidad pobre de esperma (astenozoospermia) y morfología anómala del esperma (teratozoospermia). La combinación de estos tres defectos ("*oligoastenoteratozoospermia*", OTA) es la causa más común de subfertilidad masculina. La probabilidad de concebir aumenta con el aumento de la concentración, movilidad y morfología normal de los espermatozoides. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto directrices que especifican los valores umbral de estos parámetros para clasificar las muestras de semen como normales o anómalas (10).

Sin embargo, los seminogramas rutinarios tienen muchas limitaciones que dan lugar a una proporción significativa de pacientes que presenta subfertilidad inexplicable. Para refinar el diagnóstico, se han desarrollado ensayos adicionales que proporcionan más información sobre la posible fertilización del semen humano. Estos ensayos incluyen diversos ensayos funcionales con espermatozoides (11), ensayos de morfología funcional, como el "*examen morfológico de orgánulos en espermatozoides* móviles" (MSOME, 12) y ensayos que examinan el grado de lesión del ADN en los espermatozoides, por ejemplo, el ensayo de la estructura de la cromatina del esperma (EECE,

11).

En algunos casos, la causa de la subfertilidad masculina se desconoce. Éstos incluyen varicocele, trastornos hormonales, infecciones, infertilidad inmunológica, obstrucciones del tracto genital masculino y criptorquidismo. Actualmente existen terapias médicas y quirúrgicas para estas afecciones (1). Sin embargo, en una gran cantidad de casos de subfertilidad masculina, la causa se desconoce. En estos casos, al hombre subfértil pueden aplicarse diversos tratamientos, con frecuencia basados en fines específicos. Estos tratamientos incluyen antiestrógenos, inhibidores de aromatasa, andrógenos, FSH, pentoxifilina, arginina, carnitina, glutatión, vitaminas (A, C y E) y oligominerales (cinc, selenio) (1).

Cuando un tratamiento de infertilidad masculina no conduce a un embarazo después de un periodo de tiempo razonable o si las mediciones de diagnóstico muestran que no es posible mejorar el estado de fertilidad, entonces pueden considerarse técnicas de reproducción asistida (TRA). Los diversos procedimientos de reproducción asistida mejoran el potencial de fertilización del esperma superando algunas o todas las barreras de migración del tracto genital inferior y superior femenino así como las inversiones de los óvulos. Los procedimientos de TRA actualmente habituales incluyen inseminación intrauterina (IIU, 2, 3), fertilización clásica *in vitro* (FIV, 4, 5), y FIV-inyección espermática intracitoplasmática (FIV-IEIC, 6). Una mejora en la IEIC es una técnica conocida como "*inyección intracitoplasmática morfológicamente seleccionada*" (IIMS, 7-9) en la que, utilizando microscopía de alta potencia, se examina la buena morfología de los espermatozoides móviles y los espermatozoides que presentan la mejor morfología del núcleo se seleccionan para realizar la IEIC.

Se ha observado que, "in vitro", los espermatozoides de diversas especies se unen a y captan ADN exógeno (13). La unión al ADN está mediada, al menos en parte, por moléculas de CD4 y MHCII presentes en la superficie de los espermatozoides y está antagonizada por la glucoproteína IF-1, presente en el líquido seminal. La interacción del esperma con ADN extracelular libre de células activa nucleasas intracelulares, tales como DNasa, que escinden el ADN genómico del esperma, conduciendo eventualmente a un proceso de muerte celular parecido al de la apoptosis.

La DNasa I bovina se ha utilizado clínicamente desde 1965. En los antiguos países soviéticos ésta se utilizaba para tratar infecciones producidas por virus de ADN tales como Herpes y adenovirus. Se cree que la DNasa degrada el ADN viral a mono y oligonucleótidos. Esta medicación se utiliza normalmente para tratar infecciones causadas por Herpes simple de tipo 2 (herpes genital), infecciones herpéticas oculares, producidas por Herpes simple, infecciones por Herpes zoster, inflamación del tracto respiratorio tales como bronquitis y neumonía y tuberculosis. Para estas aplicaciones se administra por inyecciones intramusculares, inhalación o como gotas oculares. La DNasa I humana recombinante es otra DNasa I clínicamente utilizada. Se trata de una medicina autorizada por la FDA administrada por inhalación para tratar pacientes con fibrosis quística (FQ). En estos pacientes la retención de secreciones purulentas viscosas en las vías respiratorias contribuye a reducir la función pulmonar y a agravar las infecciones. Las secreciones pulmonares purulentas contienen concentraciones muy altas de ADN extracelular liberado por leucocitos degenerativos que se acumulan en respuesta a la infección. La DNasa I hidroliza el ADN en el esputo de pacientes con FQ y reduce la viscoelasticidad del esputo (14).

**Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el nuevo e inesperado hallazgo de que los altos niveles de desoxioligonucleótidos libres de células, presentes en la circulación sanguínea de los hombres, están asociados con la subfertilidad y que administración de ADN exógeno libre de células reduce la calidad del esperma y produce subfertilidad. Los autores de la invención han descubierto por tanto que proporcionando a hombres subfértiles una DNasa puede mejorarse la calidad del semen y su potencial de fertilidad.

De acuerdo con la invención se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la subfertilidad masculina. La composición farmacéutica comprende un agente que bloquea el efecto de las moléculas de ácido desoxirribonucleico libre de células en los espermatozoides.

El agente es una enzima que afecta al nivel de las moléculas de ácido desoxirribonucleico libre de células en líquidos corporales. La enzima es una desoxirribonucleasa (DNasa). La DNasa puede ser una endodesoxirribonucleasa o una exodesoxirribonucleasa (la endodesoxirribonucleasa escinde dentro de las moléculas mientras que la exodesoxirribonucleasa escinde en un extremo, 3' o 5', de la molécula).

Se conoce una amplia diversidad de DNasas que se diferencian en sus especificidades por los sustratos, por sus mecanismos químicos y por sus funciones biológicas. Las DNasas no limitantes que pueden aplicarse de acuerdo con la invención son DNasa I, DNasa II, DNasa gamma, DNasa activada por caspasa (DAC), L-DNasa II, DHPII. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la DNasa es DNasa I. El origen de la DNasa puede ser de un animal, un vegetal, una bacteria, un virus, una levadura o un protozoo, o puede ser una DNasa recombinante, preferentemente una DNasa recombinante humana.

La composición puede incluir, en combinación con el agente, transportadores farmacéuticamente aceptables. La expresión "*vehículo farmacéuticamente aceptable*" significa cualquier excipiente inerte, no tóxico, que no reaccione básicamente con el agente que interfiere con el ADN, que tiene un efecto sobre los espermatozoides y se añade a

esta para dar forma o consistencia a la composición y mejorar la protección de la degradación del agente y aumentar su supervivencia fuera y dentro del organismo y conseguir su penetración en el organismo y su liberación en los líquidos corporales y facilitar la distribución del agente en el organismo del sujeto y administrar al sitio diana (al ADN libre de células).

De acuerdo con una realización, la composición está en una forma adecuada para la administración oral. De acuerdo con otra realización, la composición está en una forma adecuada para inyección, preferentemente, inyección intramuscular (IM), subcutánea o intravenosa (i.v.). De acuerdo con otra realización más, la composición está en la forma adecuada para inhalación. Aunque también pueden aplicarse otras formas de administración, debe observarse que la administración oral es una vía preferida de acuerdo con la invención debido al mayor cumplimiento del tratamiento.

Las muestras de semen obtenidas de hombres tratados con la composición de la invención pueden usarse en cualquier técnica de reproducción asistida (TRA) convencional. Una lista no limitante de técnicas de reproducción asistida incluye inseminación intrauterina (IIU), fertilización *in vitro* (FIV clásica), inyección espermática intracitoplasmática (IEIC) e inyección intracitoplasmática morfológicamente seleccionada (IIMS) así como otras técnicas conocidas en el campo de la fertilidad.

El agente usado en la invención se administra y dosifica de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección clínica del sujeto masculino, el sitio y procedimiento de administración, el régimen de administración, la edad, peso corporal y otros factores del sujeto conocidos por el médico tratante. Las dosis pueden ser dosis sencillas o múltiples durante un solo día o durante un período de varios días/semanas/meses (etc.). Generalmente el tratamiento tiene una duración proporcional a la gravedad de la afección de subfertilidad, a la eficacia del agente y al sujeto masculino que vaya a tratarse.

La dosificación puede determinarse fácilmente administrando a una pluralidad de sujetos sometidos a ensayo (sujetos que presentan subfertilidad) diversas cantidades del agente ensayado y después representando gráficamente el cambio de la calidad del semen en función de la dosificación. Como alternativa, la dosificación puede administrarse a través de experimentos realizados en modelos animales apropiados y después extrapolando a seres humanos utilizando uno de una pluralidad de procedimientos de conversión. Como se sabe, la cantidad que se considera que es eficaz en un sujeto puede depender de diversos factores tales como el modo de administración (por ejemplo, la administración oral puede requerir una dosis más alta para conseguir un nivel plasmático determinado del agente que la administración intravenosa); la edad, el peso, el área superficial corporal, el estado de salud y factores genéticos del sujeto; así como fármacos que se administran simultáneamente al sujeto.

La duración del tratamiento debe determinarse de acuerdo con la cantidad y la calidad del semen. La espermatogénesis se produce en los testículos y dura aproximadamente 64 días en seres humanos. Se produce después de 8-10 días de transporte a través del epidídimo (TEP). El efecto perjudicial del ADN libre de células se observa en diferentes secciones del tracto genital masculino: los túbulos seminíferos de los testículos y el epidídimo caudal. Por tanto, el ADN libre de células puede afectar a diferentes fases de la espermatogénesis, produciendo daños a los espermatozoides manifestados a diferentes niveles de gravedad. Los daños en los testículos son tanto cuantitativos como cualitativos mientras que los daños en el epidídimo son principalmente cualitativos. Por tanto la duración del tratamiento puede variar y debe determinarse de acuerdo con la cantidad y la calidad del semen. Preferentemente la duración del tratamiento se selecciona de los siguientes regímenes:

Tratamiento agudo:

A. 10 días – Este curso se dirige a reducir el efecto del ADN libre de células en los espermatozoides durante el transporte a través del epidídimo.
B. 16 días – Este curso se dirige a reducir el efecto del ADN libre de células en los espermatozoides durante la fase de maduración de la espermiogénesis y durante el transporte a través del epidídimo.

Tratamientos semicrónicos:

C. 26 días – Este curso se dirige a reducir el efecto del ADN libre de células en los espermatozoides durante un ciclo espermatogénico y durante el transporte a través del epidídimo.
D. 32 días – Este curso se dirige a reducir el efecto perjudicial del ADN libre de células en los espermatozoides durante toda la espermiogénesis y durante el transporte a través del epidídimo.

Tratamientos crónicos:

E. 74 días – Este curso se dirige a reducir el efecto perjudicial del ADN libre de células en los espermatozoides durante toda la espermatogénesis y durante el transporte a través el epidídimo.

**Breve descripción de los dibujos**

Para entender la invención y para ver cómo puede llevarse a cabo en la práctica, ahora se describirá una realización preferida, solo como ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

**la Fig. 1** es un histograma que muestra la concentración de ADN en hombres fértiles y subfértiles.
**la Fig. 2** muestra un histograma del efecto de inyecciones de ADN sobre el potencial de fertilidad de ratones macho;
**la Fig. 3** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones de ADN libre de células a ratones sobre la estabilidad de la cromatina en espermatozoides;
**la Fig. 4** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones de ADN libre de células a ratones sobre el porcentaje de espermatozoides que expresan el receptor Fas;
**la Fig. 5** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones de ADN libre de células a ratones sobre la actividad de la caspasa 3 en sus espermatozoides;
**la Fig. 6** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones de ADN libre de células a ratones sobre la actividad de la DNasa endógena en sus espermatozoides;
**la Fig. 7** muestra el daño morfológico producido al tejido testicular por inyección de ADN;
**la Fig. 8** muestra el daño apoptótico producido al tejido testicular por inyecciones de ADN (tinción TUNEL);
**la Fig. 9** muestra la cuantificación del daño apoptótico producido al tejido testicular por inyecciones de ADN;
**la Fig. 10** muestra el daño morfológico y apoptótico producido al tejido testicular por inyecciones de ADN (tinción TUNEL);
**la FIG. 11** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre la densidad de esperma en semen de hombres subfértiles;
**la Fig. 12** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre la movilidad del esperma en semen de hombres subfértiles;
**la Fig. 13** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre la movilidad progresiva del esperma en semen de hombres subfértiles;
**la Fig. 14** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides normales en el semen de hombres subfértiles y realizado de acuerdo con la OMS utilizando microscopía óptica;
**la Fig. 15** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con diferentes defectos en la cabeza en el semen de hombres subfértiles realizado de acuerdo con la OMS utilizando microscopía óptica;
**la Fig. 16** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con cabezas amorfas en el semen de hombres subfértiles realizado de acuerdo con la OMS utilizando microscopía óptica;
**la Fig. 17** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con defectos en segmentos centrales en el semen de hombres subfértiles realizado de acuerdo con la OMS utilizando microscopía óptica;
**la Fig. 18** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides en el semen de hombres subfértiles;
**la Fig. 19** es un histograma que muestra el efecto de inyecciones intramusculares de DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides que expresan el receptor Fas en el semen de hombres subfértiles;
**la Fig. 20** es un histograma que muestra el efecto de la administración oral de DNasa sobre la densidad del esperma;
**la Fig. 21** es un gráfico que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre el volumen del semen;
**la Fig. 22** es un histograma que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre la concentración de los espermatozoides;
**la Fig. 23** es un gráfico que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal del núcleo realizado por MSOME;
**la Fig. 24** es un gráfico que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre la cantidad de espermatozoides con morfología normal del núcleo realizado por MSOME;
**la Fig. 25** es un histograma que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con morfología de cabeza estrecha, realizado por MSOME;
**la Fig. 26** es un histograma que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre la estabilidad de la cromatina en espermatozoides;
**la Fig. 27** es un gráfico que muestra el efecto de la administración oral de la DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides que expresan el receptor Fas;
**la Fig. 28** es un gráfico que muestra el efecto de la inhalación de la DNasa sobre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal del núcleo realizado por MSOME;
**la Fig. 29** es un histograma que muestra la inhibición de la actividad de la DNasa interna en espermatozoides por citrato, un inhibidor de la DNasa;
**la Fig. 30** es un histograma que muestra la expresión del receptor Fas sobre la superficie de espermatozoides de hombres fértiles y subfértiles;
**la Fig. 31** es un histograma que muestra la actividad de la caspasa-3 en espermatozoides que expresan el receptor Fas o en espermatozoides que no expresan el receptor Fas de hombres subfértiles;
**la Fig. 32** es un histograma que muestra el número de descendientes obtenido en inseminación artificial de ratones utilizando espermatozoides que expresan el receptor Fas o espermatozoides que no expresan el receptor de Fas;
**la Fig. 33** es un histograma que muestra el número de cigotos 2PN obtenido en inseminación artificial de ratones utilizando espermatozoides que expresan el receptor Fas o espermatozoides que no expresan el receptor Fas;

**la Fig. 34** muestra el desarrollo embrionario en ratones después de fertilización natural o después de inseminación artificial utilizando espermatozoides que expresan el receptor Fas o espermatozoides que no expresan el receptor Fas;
**la Fig. 35** es un histograma que muestra el porcentaje de espermatozoides que expresan el receptor Fas en el semen de hombres subfértiles con éxito o fracaso en un tratamiento de IIU; y
**la Fig. 36** es un histograma que muestra la actividad DNasa en plasma de sangre de ratón después de la administración de la DNasa.

**Ejemplos**

*Materiales*

Solución de ADN convencional:

En agua de doble destilación (ADD) se disolvió ADN de timo de ternero 100 mM.

Solución de DPA:

En 100 ml de ácido acético glacial se disolvieron 1,5 g de difenilamina y se añadieron 1,5 ml de ácido sulfúrico. El día del uso, se añadieron 0,5 ml de acetaldehído.

Solución de polivinil pirrolidona (PVP):

Se obtuvo medio PVP 10890001 de Medi-Cult.

Tampón de reacción de actividad DNasa de Kunitz:

$MgSO_4$ 5 mM x $7H_2O$, acetato de Na 0,1 M pH 5, ADN de timo de ternero 4 mg %

*Procedimientos*

**Niveles de ADN y de desoxioligonucleótidos (procedimiento de Burton):**

La solución de ADN convencional se diluyó a 5, 10, 20 y 50 μg/ml en 166 μl. A cada 166 μl de muestras de plasma o de muestra de ADN convencional se añadieron 166 μl de $NClO_4$ 1 N y 664 μl de solución de DPA. Las muestras se incubaron a 37 ºC durante 20 h, y después se centrifugaron durante 10 min (15.000 g, 37 ºC). A una placa de 96 pocillos se transfirieron 300 μl de sobrenadante y se realizaron mediciones en un espectrofotómetro a 60 nm.

**Volumen del semen, densidad y concentración del esperma:**

El volumen de cada eyaculación seminal se midió utilizando una pipeta.

La concentración del esperma se determinó contando las células utilizando el hemocitómetro de Helber o el hemocitómetro de Neubauer (el Helber se usa cuando la concentración del esperma es mayor y el Neubauer cuando es menor).

La densidad del esperma (=número de células en toda la eyaculación) se calculó multiplicando el volumen de la eyaculación por la concentración del esperma.

**Motilidad del esperma y motilidad progresiva:**

Los espermatozoides móviles y no móviles se contaron utilizando el hemocitómetro de Helber o el hemocitómetro de Neubauer y el porcentaje de espermatozoides móviles se calculó de acuerdo con esto. Se examinó la movilidad progresiva de una muestra de 20 espermatozoides móviles al azar examinando su capacidad para avanzar en una línea recta a través de 200 μm y el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles se calculó de acuerdo con esto.

**Morfología del esperma utilizando la técnica de tinción con eosina-nigrosina:**

Los espermatozoides se tiñeron utilizando una tinción nuclear de eosina al 2 % y nigrosina al 10 % para el fondo. Se evaluaron 50 espermatozoides utilizando microscopía óptica con un aumento de 1000x con aceite de inmersión. El análisis de la morfología del esperma se midió de acuerdo con las directrices de la OMS (10).

**Examen morfológico de orgánulos en espermatozoides móviles (EMOEM) en seco y en húmedo (regular):**

Preparación del esperma para la observación morfológica en EMOEM en húmedo (regular):

Una alícuota de 1-2 μl de la suspensión espermática que contenía algunos miles de espermatozoides se transfirió a una microgotita de medio espermático que contenía solución de polivinil pirrolidona (PVP) 0 % - 8 % y se colocó en una placa de fondo de vidrio con aceite de parafina. La evaluación morfológica de los espermatozoides en

movimiento fue posible creando pequeños compartimentos que se extendían desde el borde de las gotitas, que capturaban las cabezas de los espermatozoides móviles.

Preparación de esperma para la observación morfológica en EMOEM en seco:

Se transfirió eyaculado reciente post-licuado a tubos de fondo redondo de 15 ml a temperatura ambiente (22-25 ºC). Se obtuvo sedimento blando de los espermatozoides eyaculados por centrifugación en cubetas oscilantes a 1500 RPM durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante plasmático seminal se retiró. El sedimento espermático se suspendió en 1 ml de medio Ferticult-IVF (FertiPro N.V. Beernem, Bélgica) y después volvió a centrifugarse a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, los tubos se transfirieron a una incubadora con $CO_2$ al 5 %, a una temperatura a 37 ºC para una incubación de nado ascendente (*swim-up*) de 40 minutos, con una inclinación de 45 ºC. Después, el sobrenadante se retiró cuidadosamente hasta la interfase del sedimento espermático. El sobrenadante de nado ascendente se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se desechó. El sedimento se aplicó sobre portaobjetos de vidrio para microscopio y se secó al aire.

Observación EMOEM del esperma:

Con un microscopio invertido (Olympus IX70) provisto de óptica Nomarski, una lente para objetivo Uplan Apo X 100/1,35 y una lente condensadora de 0,55 NA, se examinaron espermatozoides a 21 ºC. Las imágenes se capturaron con una videocámara a color DXC-950P (Sony), que tenía una CCD de HAD de potencia de placa de 3, de 1,27 cm (½ pulgada) que contenía unos 380.000 elementos de fotografía eficaces (píxeles) para la producción de imágenes de alta calidad y una pantalla de video a color (Sony PVM-14M4E, HR-Trinitron). La evaluación morfológica se realizó en la pantalla del monitor que, con la configuración anterior, alcanzó un aumento real de 6300. Se examinaron cien espermatozoides móviles de cada muestra de esperma para determinar el estado morfológico de 6 orgánulos subcelulares: acrosoma, lámina postacrosomal, cuello, mitocondria, cola y núcleo. Los 5 primeros de estos orgánulos subcelulares se consideraron morfológicamente normales o anómalos basándose en la presencia de malformaciones específicas, que se definieron como se desvela en Bartoov y col., 1981; Glezerman y Bartoov, 1993. Para el núcleo, el estado morfológico se definió por el contenido y forma de la cromatina. Los criterios de un núcleo con una forma normal por EMOEM eran configuraciones suaves, simétricas y ovales. El intervalo normal de la longitud y anchura del núcleo del espermatozoide se tomó como 4,75 ± 0,20 μm y 3,28 ± 0,20 μm, respectivamente (promedio ± desviación típica) mientras que los espermatozoides fuera de este intervalo se consideraron anómalos. La masa de la cromatina nuclear era homogénea, sin trastornos nucleares regionales y solo contenía una vacuola con diámetros límite de 0,78 ± 0,18 μm desde la vista frontal. Para considerarse morfológicamente normal, un núcleo espermático debía tener una forma normal y un contenido de cromatina normal. Un espermatozoide que presentaba un núcleo normal así como un acrosoma, una lámina postacrosomal, un cuello, una cola, mitocondrias normales y sin gota citoplasmática o citoplasma alrededor de la cabeza se clasificaba como morfológicamente normal.

**Ensayo de la estructura de la cromatina del esperma (EECE):**

El EECE determina el porcentaje de espermatozoides con estructura normal de la cromatina. La estructura anómala de la cromatina se definió como la susceptibilidad aumentada del ADN espermático a la desnaturalización *in situ* inducida por ácidos. Se determinaron cantidades de desnaturalización de ADN por célula mediante citometría de flujo que mide el cambio de fluorescencia verde (ADN nativo) a roja (ADN monocatenario, desnaturalizado), en núcleos teñidos con naranja de acridina. Este cambio se expresó como IFA (Índice de Fragmentación del ADN), que es la proporción de intensidad de fluorescencia roja en relación con la total (roja + verde), representando la cantidad de ADN monocatenario desnaturalizado sobre el ADN celular total. En el EECE, se calculó el IFA de cada espermatozoide en una muestra, y los resultados se expresaron como la media de 5000 espermatozoides. Se mezclaron alícuotas de 100 μl de suspensión de espermatozoides con solución tampón TNE 2 ml (Tris 0,01 4M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, pH 7,4) y se centrifugó a 400 x $g_{máx}$ durante 15 min a 25 ºC. El sedimento final se resuspendió en tampón TNE 2 ml. La suspensión se centrifugó a 3000 x $g_{máx}$ durante 15 min a 4 ºC. El sedimento obtenido de núcleos se fijó pipeteando enérgicamente en una solución de fijación de 500 μl (acetona: etanol al 70 %, 1:1 v/v). Todas las etapas del procedimiento anterior se realizaron a 4 ºC. La muestra se centrifugó a 3000 x $g_{máx}$ durante 15 min a temperatura ambiente y el sedimento se mezcló con 100 μl de solución de detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 al 0,1 %, pH 1,2) durante 30 segundos a 4 ºC. Después, la muestra se tiñó añadiendo 5 μl de solución de tinción de naranja de acridina (AO) que contenía 6 mg/ml de AO. La muestra se diluyó con 500 μl de tampón cítrico (ácido cítrico 0,037 M, $Na_2HPO_4$ 0,126 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, pH 6,0). Después de esto, la muestra se sometió a citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSort de Becton-Dickenson, San Francisco, CA, Estados Unidos equipado con un ultra detector y un láser de iones argón de 15 mW con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La proporción IFA se calculó con un paquete de programación informática ratio-time 1.1 escrito por Jan van der Aa (Becton-Dickenson, Erembodegem, Bélgica) y con el programa informático WinMDI 2,8. El Índice de Fragmentación del ADN (IFA) es la fluorescencia media de los espermatozoides con fragmentación de ADN nuclear. El % del Índice de Fragmentación del ADN (% IFA) es el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN nuclear. Este parámetro se computó basándose en la distribución del IFA.

**Actividad DNasa intracelular y plasmática en sangre:**

Se sometieron espermatozoides a tres ciclos de congelación y descongelación y después se centrifugaron durante 10 min (27.000 g, 4 ºC). El plasma se separó de la sangre por centrifugación en tubos con EDTA, se añadieron 0,3 ml del sobrenadante a 0,6 ml de tampón de actividad DNasa y la mezcla se midió en un espectrofotómetro a 260 nm frente a una referencia que solo contenía tampón y medio. Se realizaron curvas de calibración usando una DNasa I bovina comercial. La DNasa interna en los espermatozoides se midió en unidades Kunitz. Una unidad Kunitz se define como la cantidad de DNasa que produce un aumento de 1 D.O. por minuto a 260 nm en una trayectoria de 1 cm a pH 5 a 25 ºC, en una tampón de reacción que contiene $MgSO_4$ 5 mM x 7 $H_2O$, Acetato de Na 0,1 M pH 5 y ADN de timo de ternero 4 mg%. La DNasa plasmática se midió en unidades Bartoov. Una unidad Bartoov (UB) se define como la cantidad de enzima que produce un $\Delta A_{260}$ de 0,001 por minuto en una trayectoria de 1 cm a pH 7,5 a 25 ºC, en un tampón de reacción que contiene Tris 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, $MnCl_2$ 10 mM y ADN de timo de ternero 0,05 mg/ml.

**Expresión del receptor Fas en espermatozoides:**

Los espermatozoides se lavaron con PBS y se incubaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 30 min a 25 ºC. Después, los espermatozoides se incubaron durante 15 min en solución de bloqueo (BSA al 1 % en PBS) y después se incubó durante 40 min con anticuerpos anti-receptor Fas de cabra. El anticuerpo anti-receptor Fas humano se marcó con FITC y no se necesitó anticuerpo secundario. Cuando se utilizaban espermatozoides de ratones, las células se lavaban con PBS y se incubaban durante 30 min con un anticuerpo secundario anti-cabra marcado con FITC. Las células se lavaron y la fluorescencia se midió en un Citómetro de Flujo FACSort de Becton-Dickenson.

**Actividad caspasa-3 en espermatozoides:**

La actividad caspasa-3 se midió utilizando un kit calorimétrico obtenido en R&D Company. Los espermatozoides se lavaron con PBS, se incubaron en tampón de lisis durante 10 min a 4 ºC y se centrifugaron durante 1 min a 10000 g. Se añadieron 50 μl de tampón de reacción y 5 μl de sustrato colorimétrico de caspasa 3 a cada 50 μl de sobrenadante y la mezcla se incubó durante 2 h a 37 ºC. La actividad se midió en un espectrofotómetro a 405 nm.

**Separación de espermatozoides que expresan el receptor Fas de espermatozoides que no expresan el receptor Fas:**

Los espermatozoides se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con anticuerpos anti-receptor Fas de cabra. El anticuerpo anti-receptor Fas humano se marcó con biotina y no se necesitó anticuerpo secundario. Cuando se usaban espermatozoides de ratones, las células se lavaban con PBS y se incubaban durante 30 min más con un anticuerpo secundario, anti-cabra marcado con FITC. Después, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 min con anticuerpo anti-biotina conjugado con microperlas que contenían iones de hierro (de Myltenyi Biotech Company) para determinar la actividad caspasa, o anticuerpo anti-FITC conjugado con estas microperlas para la inseminación en ratones. La separación de espermatozoides positivos y negativos al receptor Fas se realizó de la siguiente manera: Las células se lavaron con PBS y se transfirieron a través de una columna de separación inmunomagnética de MACS de la Myltenyi Biotech Company. Los espermatozoides no marcados que no expresaban el receptor Fas fluyeron a través de la columna sin unirse. Los espermatozoides que expresaban el receptor Fas se unieron a la columna y se eluyeron después utilizando presión a pistón.

**Examen de DNasa plasmática en ratones después de administración oral o inyección**

Ratones C57/negros se dejaron en ayunas durante 12 h y después recibieron administración oral de PBS (placebo n=10) o administración oral de 9 mg de DNasa I en 200 μl de PBS (n=14) o inyección intraperitoneal de 3 mg de DNasa I en 200 μl de PBS (n=6). Los ratones control no se trataron de ninguna manera (n=10). Se extrajo sangre del corazón de los ratones 40 min después de la inyección o 1 h después de la administración oral. El plasma se separó de la sangre por centrifugación en tubos con EDTA y se conservó a -20 ºC. La actividad DNasa en el plasma se determinó en unidades Bartoov.

***Resultados***

***Efectos in vivo del ADN libre de células***

Como se observa en la Fig. 1, los niveles de ADN endógeno libre de células son elevados en la sangre de hombres subfértiles en comparación con hombres fértiles, lo que indica una correlación entre el nivel alto de ADN en sangre y la subfertilidad. De hecho, la inyección intravenosa de ADN libre de células en ratones macho deterioró su potencial de fertilidad: dos grupos de 10 ratones macho recibieron inyecciones intravenosas de 200 μg de ADN libre de células o PBS durante 15 días. Después, los ratones se aparearon con hembras y se contó la cantidad de descendientes en ambos grupos. La Fig. 2 muestra que el emparejamiento con los ratones de control produjeron 6,9 ± 1,7 descendientes por hembra mientras que el emparejamiento con los ratones a los que se les inyectó ADN produjeron 0,7 ± 2,2 descendientes por hembra. Además, la inyección intravenosa de ADN libre de células en los ratones deterioró la calidad nuclear de sus espermatozoides, observada por una reducción en la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides expresada en un aumento en el IFA (Fig.3). Además, la inyección intravenosa de ADN libre

de células en ratones indujo activación de los marcadores apoptóticos, receptor Fas, caspasa 3 y DNasa dentro sus espermatozoides (Figs. 4-6).

La inyección de ADN libre de células afecta no solo a los espermatozoides sino también al tejido testicular. Como se observa en las Figs. 7 y 10, el ADN libre de células produjo la aparición de células gigantes y el empobrecimiento del epitelio de los túbulos esfacelando células germinales maduras e inmaduras testiculares en el lumen de los túbulos. La inyección de ADN libre de células también produjo la aparición de grandes áreas apoptóticas (Figs. 8-10). La espermatogénesis en los testículos dura aproximadamente 64 días en seres humanos. Por tanto, se espera que el deterioro en los testículos producido por el ADN tenga un impacto sobre el desarrollo de los espermatozoides durante un largo periodo de tiempo y la reparación de dicho daño requerirá un tratamiento prolongado.

**Administración intramuscular de DNasa I**

Para examinar si la DNasa podía mejorar la calidad del semen y el potencial de fertilidad, se administró a hombres subfértiles. En un grupo de 11 parejas en las que los hombres se habían identificado previamente como subfértiles y que no podían concebir en un tratamiento de FIV-IEIC, los hombres recibieron cuatro veces al día 25 mg de DNasa I bovina por inyección intramuscular (IM) durante un periodo de 7-10 días. 7-11 días después de la primera inyección las parejas recibieron un segundo tratamiento de IEIC. Se tomaron muestras de semen y sangre de los sujetos dos veces antes de comenzar el tratamiento y 4-7 y 8-15 días antes de la primera inyección y se analizaron. Como se muestra en la Fig. 11, el análisis de semen reveló que la densidad del esperma aumentó al 70 % después de 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (24,28 ± 14,73 x $10^6$ células/eyaculado frente 14,31 ± 10,15 x $10^6$ células/eyaculado respectivamente, P < 0,08). Además se observó un aumento del 60 % en la movilidad del esperma después de 4-7 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (30,6 ± 12,6 % frente a 19 ± 11,3 % respectivamente, P<0,033, Fig. 12) y se observó un aumento del 76 % en la movilidad progresiva del esperma después de 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (47 ± 33,1 % frente a 26,7 ± 23,4 % respectivamente, P< 0,010, Fig. 13).

La morfología de los espermatozoides se analizó de acuerdo con las directrices de la OMS (10). Después de 8-15 días de tratamiento con DNasa, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente conformados en el semen de los sujetos se elevó en un 129 % en comparación con el tratamiento previo (19,9 ± 12,1 % frente a 8,7 ± 15,6 % respectivamente, P< 0,098, Fig. 14). Además se observó que el tratamiento con DNasa produjo una reducción del 24 % en el porcentaje de defectos totales en la cabeza después de 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (57,3 ± 17,5 % frente a 77,3 ± 13,4 % respectivamente, P< 0,015, Fig. 15). En particular, se observó una reducción del 73 % en el porcentaje de cabezas amorfas después de 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (9,4 ± 7,3 % frente a 34,5 ± 29,3 % respectivamente, P< 0,043, Fig. 16). Además se observó una reducción del 60 % en el porcentaje de defectos en segmentos centrales después de 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (5,4 ± 5,1 % frente a 13,5 ± 8,6 % respectivamente, P< 0,040, Fig. 17). La morfología de los espermatozoides se analizó también por EMOEM en 3 sujetos. Se observó una mejora en diversos parámetros EMOEM en estos sujetos después del tratamiento con DNasa (Tabla 1). En particular, hubo una mejora en el porcentaje de espermatozoides con núcleo normal.

**Tabla 1**

| | Sujeto Nº 1 | | Sujeto Nº 2 | | Sujeto Nº 3 | | Promedio | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Antes del tratamiento | Después de 10 días de tratamiento | Antes del tratamiento | Después de 10 días de tratamiento | Antes del tratamiento | Después de 11 días de tratamiento | Antes del tratamiento | Después del tratamiento |
| Espermatozoides considerados para análisis EMOEM (%) | 90,7 | 94 | 95,3 | 98 | 83,4 | 90,7 | **89,9** | **94,2*** |
| Espermatozoides no considerados para análisis EMOEM (%) | 9,3 | 6 | 4,7 | 2 | 16,65 | 9,3 | **10,2** | **5,8*** |
| Espermatozoides con núcleo normal (adecuados para selección IIMS, primera y segunda elección) (%) | 4 | 7,3 | 1,3 | 5,4 | 1,6 | 2,7 | **2,3** | **5,1*** |
| *P < 0,093 | | | | | | | | |

El daño del ADN en los espermatozoides se correlaciona con tasas de concepción disminuidas así como con la salud de la descendencia. Uno de los procedimientos más empleados para evaluar este daño es el "ensayo de la estructura de la cromatina del esperma" (EECE), que mide la estabilidad de la cromatina del esperma en células expuestas a medios ácidos. La Fig. 18 muestra que el tratamiento con DNasa produce una elevación en la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides (valores más bajos de % DFI) después de 4-7 de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (15,1 ± 12,4 % frente a 25 ± 19,6 % respectivamente, P< 0,033). Además el tratamiento con DNasa produce una reducción en la expresión del marcador apoptótico, el receptor Fas, en los espermatozoides después de 4-7 y 8-15 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (26,5 ± 12,5 % y 29,2 ± 17,4 % frente al 39,7 ± 23 % respectivamente, P< 0,009 durante 4-7 días y P< 0,023 durante 8-15 días, Fig. 19).

Cuatro de las 11 parejas (36 %) lograron el embarazo después del segundo tratamiento con IEIC que se realizó después del tratamiento con DNasa. La tasa promedio de embarazo de un primer ciclo IEIC en el centro de FIV en el que se realizó este análisis es del 25 % [intervalo del 18 % al 32 %]. La tasa de embarazo de un segundo ciclo IEIC de pacientes no tratados en este centro de FIV se desconoce ya que después de una IEIC infructuosa, no realizaron una segunda IEIC sino que más bien los fracasos de la ICSI recomendaron el uso de inseminación de donantes. En cualquier caso, la tasa de éxito del 36 % del segundo tratamiento IEIC está por encima del 25 % del centro de FIV, por tanto está claro que el tratamiento con DNasa mejora las probabilidades de embarazo de los tratamientos IEIC.

Los resultados de las Figs. 11 a 19 y de la Tabla 1 muestran que la administración intramuscular de DNasa I mejoró el semen en la mayoría de los parámetros de calidad del semen. La densidad del esperma mejoró en un 70 % al final del experimento. La movilidad del esperma mejoró en un 60 % después de 4-7 días de tratamiento pero se produjo una reducción en la movilidad más tarde posiblemente debido a una respuesta inmunitaria que se produjo sobre el séptimo día y se observó como una fiebre de 24 horas. La movilidad progresiva del esperma mejoró en un 76 % al final del experimento. La elevación en la movilidad y densidad del esperma mejoró el potencial de fertilidad de los sujetos y permitió a los que no tuvieron éxito en el primer tratamiento IEIC concebir en un segundo tratamiento IEIC y posiblemente también en otros tratamientos de TRA tales como la FIV clásica o incluso tratamiento IIU.

La administración intramuscular de DNasa también mejoró la morfología del esperma, analizada de acuerdo con las directrices de la OMS (10). El porcentaje de espermatozoides normales se elevó en un 129 %. El porcentaje de espermatozoides con defectos en la cabeza se redujo en un 24 % y llegó a un valor normal (≤65). El porcentaje de espermatozoides con cabezas amorfas se redujo en un 73 % y el porcentaje de espermatozoides con defectos en los segmentos centrales se redujo en un 60 %. También se observó una mejora en la morfología del semen usando EMOEM. El número de espermatozoides considerados para análisis EMOEM y el número de espermatozoides con núcleo normal aumentó después del tratamiento. El número de espermatozoides con vacuolas nucleares, el número de espermatozoides con forma estrecha y el número de espermatozoides con trastorno regional se redujo.

Además, el tratamiento con DNasa redujo daños en los espermatozoides. El daño en la cromatina de los espermatozoides (evaluado mediante el EECE) se redujo en un 40 % después de 4-7 días de tratamiento y la expresión del marcador apoptótico, el receptor Fas, se redujo en un 26 % después de 4-7 días y en un 33 % después de 8-15 días. Se esperaba que la mejora en la calidad del semen observada después del tratamiento con DNasa mejorase el potencial de fertilidad y de hecho se observó un aumento en la tasa de éxito del tratamiento IEIC después del tratamiento.

**Administración oral de DNasa I**

Para examinar si la administración oral de DNasa I podía mejorar la calidad del semen observada con la administración intramuscular, un grupo de 9 hombres recibió por vía oral, cuatro veces al día, 50 mg de DNasa I durante un periodo de 16 días. Se tomaron y analizaron muestras de semen de los sujetos 5 días antes de comenzar el tratamiento, el día del inicio del tratamiento y los días 5, 10 y 17 del tratamiento. Como puede observarse en la Tabla 2, el análisis de semen reveló que la densidad del esperma (total de espermatozoides/eyaculado) aumentó significativamente después del tratamiento en comparación con el tratamiento previo (103 ± 50 x $10^6$ células/eyaculado frente a 42 ± 38 x $10^6$ células/eyaculado respectivamente, P< 0,05). Cuando los resultados se expresaban como % de control, se observaba un aumento en la densidad del esperma después de 5 días de tratamiento y más drásticamente después de 10 y 17 días de tratamiento (235 ± 95 %, 160 ± 72 % y 284 ± 138 % frente al 100 % en control respectivamente, P< 0,005, Fig. 20).

**Tabla 2**

| **Parámetros rutinarios** | -5 | 0 | 5 | 10 | 17 |
|---|---|---|---|---|---|
| **Volumen (ml)** | 1,2 ± 0,5 | 1,4 ± 0,6 | 1,8 ± 0,7 | 1,7 ± 0,8 | 2,6 ± 0,6** |
| **Concentración (x$10^6$ células/ml)** | 31 ± 13 | 30 ± 12 | 42 ±15 | 37 ± 12 | 45 ± 16* |

(continuación)

| Parámetros rutinarios | -5 | 0 | 5 | 10 | 17 |
|---|---|---|---|---|---|
| **Total de Espermatozoides (x10$^6$ células/ey.)** | 37 ± 30 | 42 ± 38 | 75 ±46 | 63 ± 52 | 103 ± 50 |
| **% de Movilidad del esperma** | 85 ± 22 | 52 ± 5 | 61 ± 21 | 72 ± 12 | 86 ± 33 |
| **% de Viabilidad del esperma** | 76 ± 13 | 72 ± 11 | 71 ± 12 | 71 ± 12 | 77 ±12 |
| **% de Formas normales** | 15 ± 8 | 11 ± 5 | 17 ± 16 | 18 ± 10 | 15 ± 9 |
| **% de Defectos en la cabeza** | 67 ± 10 | 70 ± 7 | 70 ± 16 | 72 ± 15 | 67 ± 9 |
| **% de Defectos en los segmentos centrales** | 6 ± 3 | 8 ± 4 | 6 ± 4 | 7 ± 2 | 6 ± 3 |
| **“ de Defectos en la cola** | 15 ± 10 | 12 ± 12 | 8 ± 6 | 12 ± 8 | 12 ± 6 |
| * p<0,05, n=9<br>** p<0,001, n=9 | | | | | |

Además, después de 17 días de tratamiento se observó un aumento en el volumen del semen (1,3 ± 0,5 ml tratamiento previo frente a 2,3 ± 0,6 ml después de 17 días de tratamiento, P < 0,001, Tabla 2 y Fig. 21). Este aumento indica una función aumentada de las glándulas accesorias. Como se observa en la Tabla 2 y en la Fig. 22, la concentración del esperma también aumentó durante el tratamiento.

Como se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 23, el análisis EMOEM mostró que el porcentaje de espermatozoides que tenían un núcleo normal aumentaba 2 veces justo después de 5 y 10 días de tratamiento en comparación con los niveles de tratamiento previo. También hubo en aumento en el número de espermatozoides con núcleo normal después de 10 y 17 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (5,0 ± 3,4 x $10^6$ células y 5,7 ± 5,10 x $10^6$ células frente a 1,6 ± 2,1 x $10^6$ células respectivamente, P < 0,05, Tabla 3 y Fig. 24). Además, se observó una disminución en los espermatozoides con cabezas estrechas después de 5, 10 y 17 días de tratamiento en comparación con el control (84 ± 15 %, 85 ± 15 % y 83 ± 21 % frente a 100 % en control, respectivamente, P < 0,05, Fig. 25).

**Tabla 3.**

| Parámetros EMOEM | -5 | 0 | 5 | 10 | 17 |
|---|---|---|---|---|---|
| **% de Núcleo normal** | 5,2 ± 2,7 | 4,7 ± 2,6 | 9,0 ± 4,3* | 10,4 ± 6,1* | 12,3 ± 6,3** |
| **Núcleo normal (x10$^6$ células)** | 2,0 ± 2,7 | 1,2 ± 0,9 | 3,0 ± 2,4 | 5,0 ± 3,4 | 5,7 ± 5,1* |
| **Formas anómalas totales** | 159 ± 31 | 154 ± 30 | 154 ± 30 | 150 ± 28 | 151 ± 30 |
| **% de vacuolas nucleares** | 80 ± 13 | 79 ± 14 | 79 ± 12 | 73 ± 13 | 77 ± 10 |
| **% de formas pequeñas** | 0,1 ± 0,3 | 0,5 ± 0,8 | 0,4 ± 1,2 | 0,1 ± 0,3 | 0,4 ± 0,6 |
| **% de formas grandes** | 3,3 ± 2,3 | 4,4 ± 2,3 | 3,9 ± 2,1 | 2,2 ± 1,4 | 2,5 ± 2,3 |
| **% de formas estrechas** | 40 ± 10 | 41 ± 14 | 33 ± 10 | 35 ± 9 | 34 ± 9 |
| **% de formas anchas** | 4,2 ± 3,0 | 3,2 ± 2,4 | 3,5 ± 2,0 | 5,2 ± 4,0 | 2,9 ± 2,0 |
| **% de trastorno regional** | 31 ± 7 | 26 ± 11 | 34 ± 8 | 34 ± 9 | 34 ± 8 |
| **Índice vacuolar** | 1,8 ± 0,3 | 1,8 ± 0,3 | 1,7 ± 0,2 | 1,6 ± 0,3 | 1,7 ± 0,3 |
| * p<0,05, n=9<br>** p<0,001, n=9 | | | | | |

Se observó un aumento en la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides (valores IFA más bajos) justo después de 5 días de tratamiento en comparación con el control (75 ± 35 % frente al 100 % respectivamente, P < 0,05, Fig. 26). Esta disminución fue más pronunciada después de 10 y 17 días (65 ± 31 % y 62 ± 33 % frente al 100

% respectivamente, P < 0,005, Fig. 26). Además el porcentaje de espermatozoides que expresaba el marcador apoptótico, el receptor Fas, disminuyó después de 10 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (10,6 ± 7,5 % frente a 35,4 ± 26,4 % respectivamente, P < 0,05, Fig. 27). Se observó una disminución adicional después de 17 días de tratamiento en comparación con el tratamiento previo (6,4 ± 5,2 % frente a 35,4 ± 26,4 %, respectivamente, P < 0,005, Fig. 27).

Entre los sujetos que participaron en el experimento de DNasa administrada por vía oral, solamente un sujeto intentó el embarazo con su pareja. Esta pareja había fracasado previamente en cuatro procedimientos IIU. Después del tratamiento con DNasa la pareja consiguió el embarazo espontáneo.

Los resultados indicados en las Figs. 20 a 27 y las en las Tablas 2 y 3 muestran que la administración oral de la DNasa I tiene los siguientes efectos:

1. Aumento del volumen del semen.
2. Aumento de la concentración y densidad de los espermatozoides.
3. Mejora de la calidad de los espermatozoides aumentando la fracción de espermatozoides que tienen un núcleo normal, aumentando la estabilidad de la cromatina y disminuyendo la proporción de células que expresan el receptor Fas.

Para examinar si la administración de la DNasa por inhalación conducía a efectos similares sobre la calidad del semen, esto se examinó para un caso. En el procedimiento de inhalación el sujeto inhaló tres veces al día 8 mg de la enzima, tomada a intervalos de 4 horas. La inhalación de la enzima condujo a una elevación en el porcentaje de núcleos normales que fue más profunda después de 9 y 17 días de inhalación (Fig. 28).

**Inhibición de la DNasa endógena en espermatozoides**

Para examinar si el citrato, un inhibidor de la DNasa, podía inhibir la DNasa intracelular en los espermatozoides, estos se incubaron con o sin citrato 10 mM durante hasta 8 horas. La actividad DNasa intracelular se midió cada hora y se calculó la suma de la actividad DNasa. La suma de la actividad de DNasa en los espermatozoides tratados con citrato fue el 43 % de la de los espermatozoides control (Fig. 29), lo que indica inhibición de la actividad DNasa intracelular por citrato.

**Relación entre la expresión del receptor Fas y la actividad caspasa 3 en espermatozoides y fertilidad**

Uno de los marcadores de apoptosis conocidos es la expresión del receptor Fas. Como se observa en la Fig. 4, la inyección de ADN libre de células a ratones conduce a una elevación estadísticamente significativa de la expresión del receptor Fas en la membrana de sus espermatozoides. La incubación *in vitro* de espermatozoides con ADN libre de células conduce también a una elevación significativa de la expresión del receptor Fas en la membrana de los espermatozoides (no mostrado). Para determinar si existe una correlación entre la expresión del receptor Fas y la fertilidad masculina, la expresión del receptor Fas sobre la superficie de los espermatozoides se determinó en hombres fértiles y subfértiles. El porcentaje de espermatozoides que expresaban el receptor Fas fue cuatro veces mayor en hombres subfértiles que en hombres fértiles (78,8 ± 27,4 frente a 12,7 + 6,4, P < 0,001, Fig. 30). A continuación para examinar si había una correlación entre la expresión del receptor Fas en espermatozoides de hombres subfértiles y la actividad del marcador apoptótico caspasa-3, se separaron espermatozoides de hombres subfértiles de acuerdo con su expresión del receptor Fas. La actividad caspasa-3 se determinó en cada población de espermatozoides. El porcentaje de actividad caspasa-3 en los espermatozoides positivos al receptor Fas fue 4 veces mayor que la actividad caspasa-3 en la subpoblación negativa al receptor Fas (207,2 ± 39,6 frente a 47,2 ± 10,5, P < 0,001, Fig. 31).

Para determinar si la expresión del receptor Fas se correlaciona con el potencial de fertilidad, se realizó el siguiente experimento: se incubaron espermatozoides de ratones con ADN libre de células (que se encontró que estimulaban la expresión del receptor Fas) y después los espermatozoides que expresaban el receptor Fas se separaron de los espermatozoides que no expresaban el receptor Fas. Se inseminaron cuatro grupos de 10 ratones hembra con espermatozoides que expresaban el receptor Fas (Fas+), espermatozoides que no expresaban el receptor Fas (Fas -), espermatozoides incubados con ADN libre de células pero que no se separaron de acuerdo con la expresión del receptor Fas, y células control que no se expusieron a ADN. Se realizaron todas las inseminaciones con el mismo número de espermatozoides. Como puede observarse en la Fig. 32, la inseminación con espermatozoides Fas(+) no dio lugar a fetos, a diferencia de la inseminación con espermatozoides Fas(-) o con espermatozoides de control que dieron lugar a 3 ± 1,4 y 2,5 ± 1,1 fetos promedio por ratón hembra, respectivamente. La inseminación con espermatozoides incubados con ADN libre de células pero no separados dio lugar solo a 0,3 ± 0,4 fetos promedio por hembra.

Para determinar la fase en la cual los espermatozoides que expresaban el receptor Fas no producían descendencia, cuatro grupos de ratones hembra se inseminaron con espermatozoides como se ha descrito anteriormente. De 16 a 20 horas después de la inseminación, se sacrificó a las hembras, se extrajeron los oocitos del oviducto y se contó el número de cigotos con 2 pronúcleos (2PN). Como se muestra en la Fig. 33, los espermatozoides Fas(+) y Fas(-) dieron lugar a un número similar de cigotos 2PN y no se observó ninguna diferencia significativa entre los

espermatozoides de control y los espermatozoides que se incubaron con ADN libre de células. Después se realizó una inseminación similar usando espermatozoides Fas(+) y Fas(-) y las hembras de ratón se sacrificaron a diferentes fases de la gestación. Se examinó el desarrollo embrionario en ambos tratamiento y se comparó con el desarrollo embrionario en la fertilización natural. No se observó desarrollo embrionario pasada la fase 2PN en hembras inseminadas con espermatozoides Fas(+) mientras que las hembras inseminadas con espermatozoides Fas(-) presentaron un desarrollo embrionario normal como en la fertilización natural (Fig. 34).

Además, en seres humanos, se examinó la correlación entre la expresión del receptor Fas en espermatozoides y el resultado del tratamiento IIU. Se examinaron muestras de semen de 72 parejas subfértiles que se sometieron a tratamiento IIU para determinar la expresión de Fas por tinción con inmunofluorescencia con el receptor anti-Fas humano y análisis FACS. En 18 casos se obtuvo embarazo mientras que los 54 casos restantes no los obtuvieron. Como se muestra en la Fig. 35, la frecuencia de espermatozoides Fas(+) en el grupo que obtuvo embarazo fue estadísticamente menor que la del grupo que no obtuvo embarazo (22,4 % ± 18,2 frente a 33,1 % ± 16,6 respectivamente, P<0,027).

**Actividad DNasa en plasma de sangre de ratón**

Para determinar la capacidad de la DNasa para llegar a la corriente sanguínea tras su administración oral, los ratones se trataron con DNasa bien por inyección intraperitoneal o por administración oral y después de 1 hora se examinó la actividad DNasa. Como se muestra en la Fig. 36, se observó un aumento significativo en la actividad DNasa en plasma de sangre tanto en los grupos tratados con inyección intraperitoneal como en los tratados por vía oral, en comparación con el grupo de control negativo (14399 ± 4000 y 10853 ± 2150, respectivamente, frente a 1345 ± 580, p<0,001). También se observó una pequeña elevación en la actividad DNasa en el grupo tratado con placebo (4055 ± 3500).

**Estudios con animales para examinar la seguridad y la eficacia de la DNasa**

Se realizó un estudio con animales para examinar la seguridad y la eficacia de la DNasa en roedores y perros en el Instituto Federal de Toxicología de Rusia. El estudio mostró que la administración aguda y prolongada de la DNasa no tenía efectos tóxicos sobre los animales de laboratorio de sangre caliente estudiados. La administración diaria prolongada (30 días) de DNasa a los animales experimentales a dosis 100 veces mayores que la dosis recomendada en seres humanos no produjo efectos perjudiciales detectables sobre los principales sistemas corporales (nervioso, cardiovascular, hematopoyético, secretor, respiratorio), el metabolismo, el estado de salud general, el desarrollo y los parámetros homeostáticos básicos del organismo. También se observó ausencia de efectos irritantes sobre el sistema digestivo después de la administración de la DNasa.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la subfertilidad masculina que comprende una desoxirribonucleasa (DNasa) y un transportador fisiológicamente aceptable.

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enzima es de origen animal, vegetal, bacteriano, viral, de levadura o de protozoo o es una enzima recombinante o una enzima recombinante humana.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en una forma adecuada para administración oral.

4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en una forma de dosificación adecuada para administración por inhalación.

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en una forma de dosificación adecuada para administración por inyección.

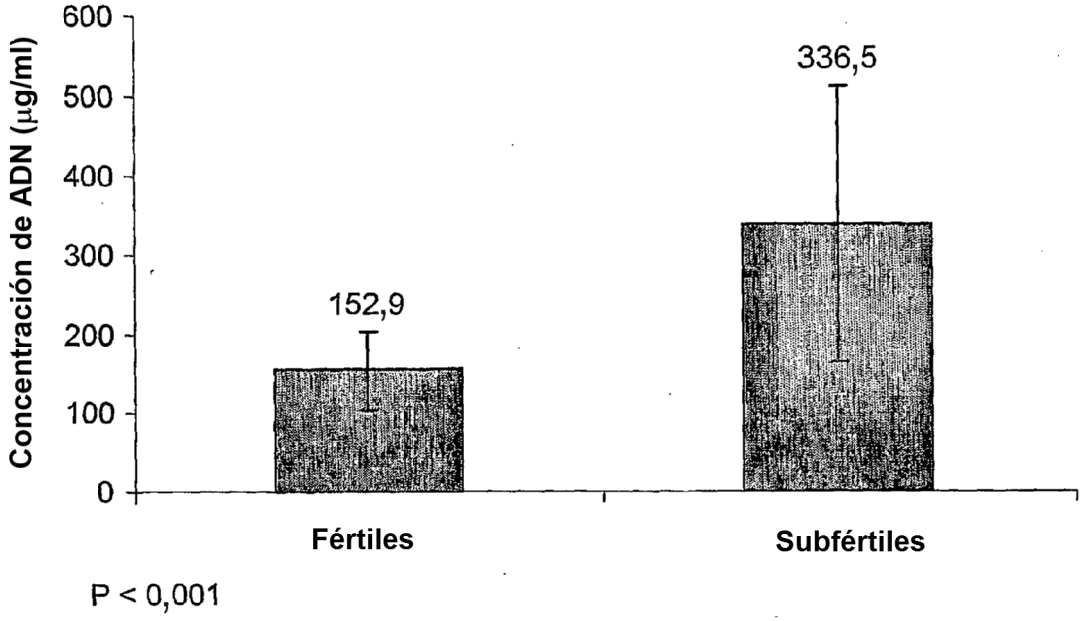



Fig. 1

**Efecto de la inyección de ADN sobre el potencial de fertilidad de ratones macho**

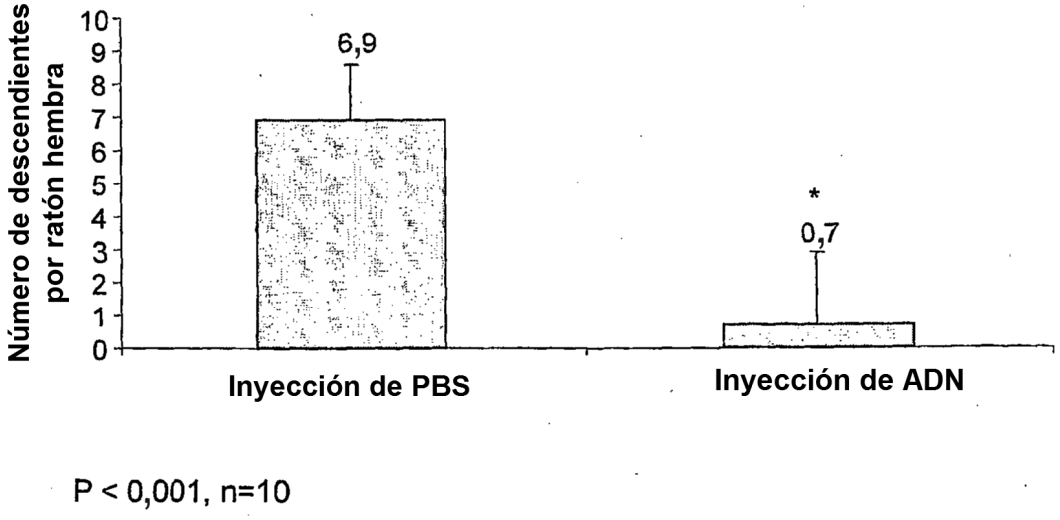
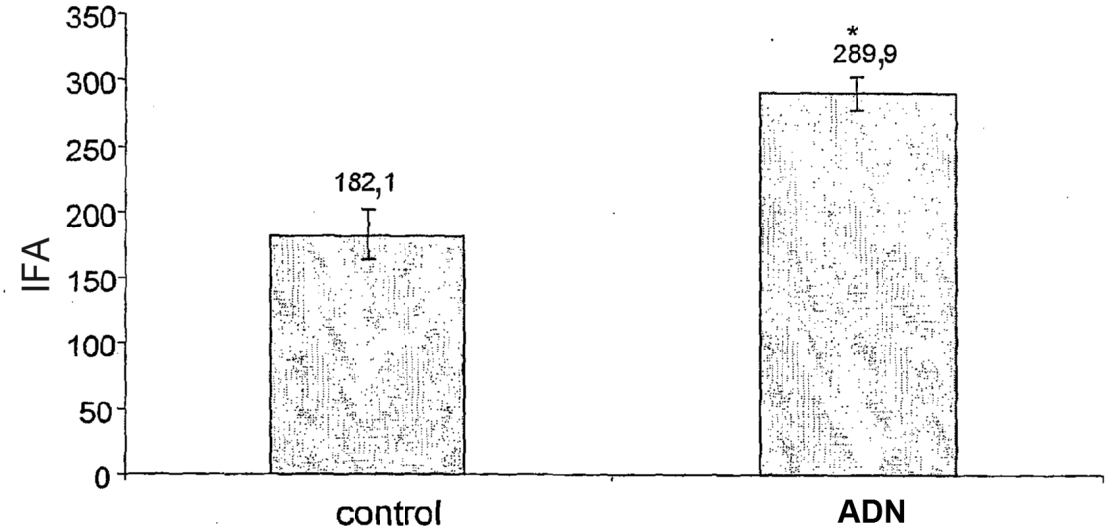



Fig. 2

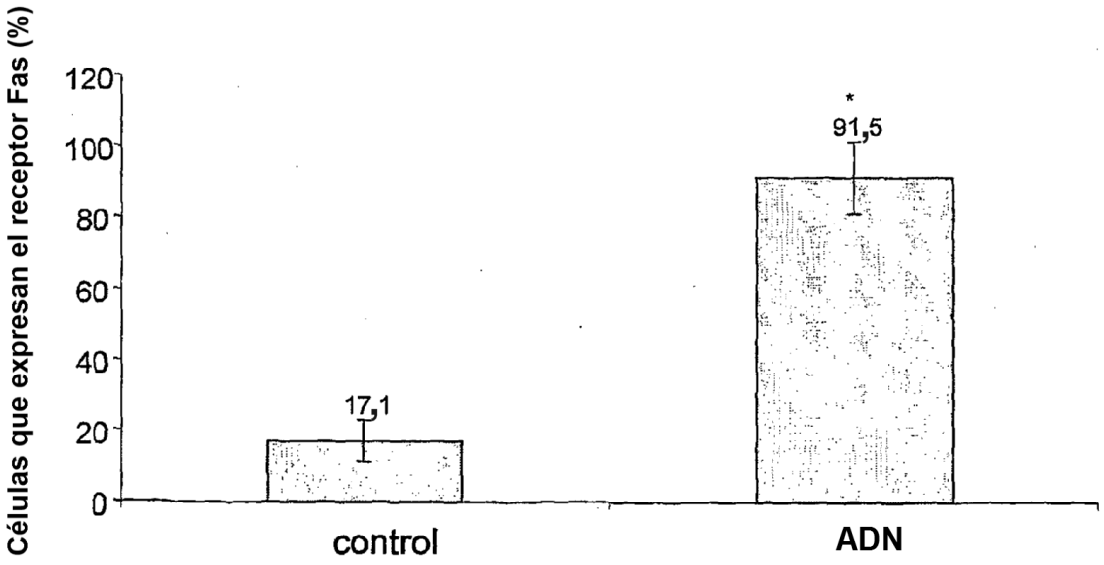
**Efecto de la inyección de ADN libre de células sobre la estabilidad de la cromatina en espermatozoides**




*P < 0,001, n=15

Fig. 3

**Efecto de la inyección de ADN libre de células sobre la expresión del receptor Fas en espermatozoides**




*P < 0,001, n=15

Fig. 4

**Efecto de la inyección de ADN libre de células sobre la actividad caspasa 3 en espermatozoides**

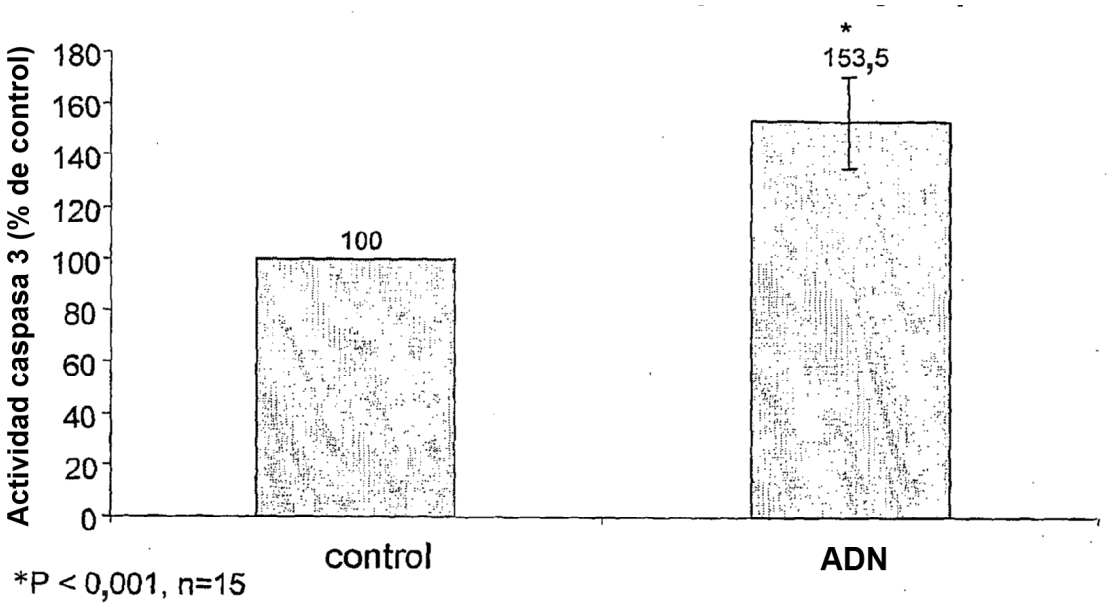



Fig. 5

**Efecto de la inyección de ADN libre de células sobre la actividad DNasa en espermatozoides**

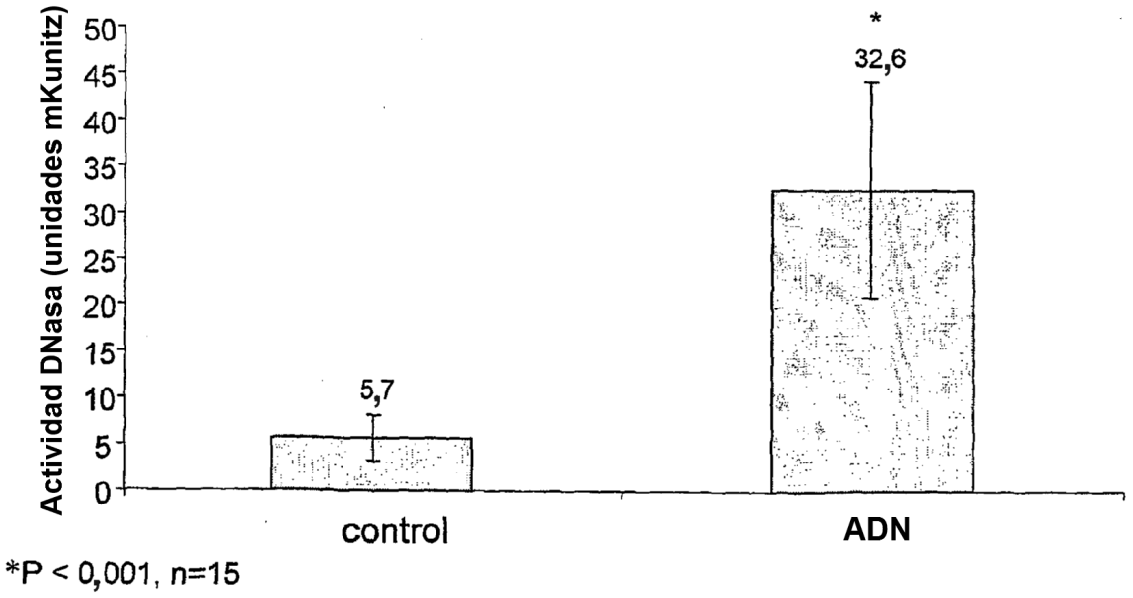



Fig. 6

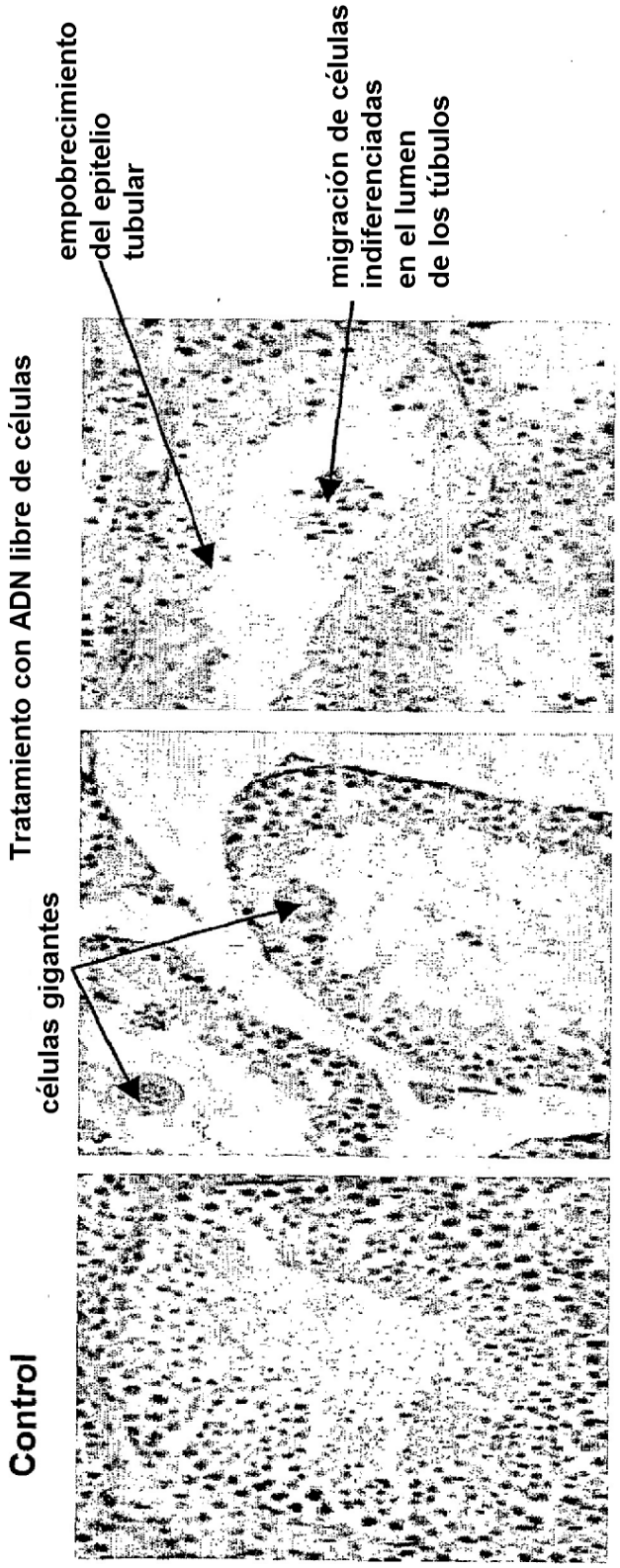

Control
células gigantes
Tratamiento con ADN libre de células
empobrecimiento del epitelio tubular
migración de células indiferenciadas en el lumen de los túbulos

Fig. 7

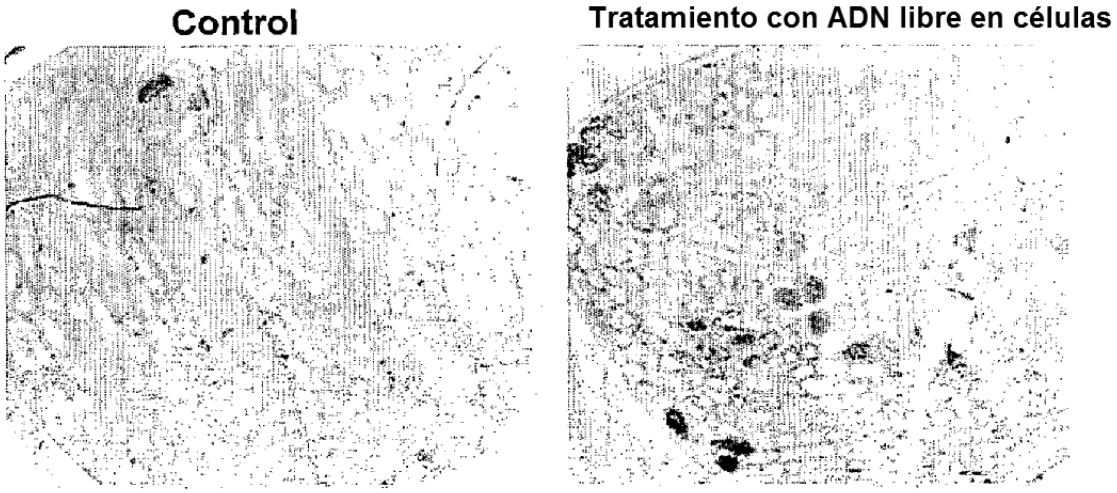

Control
Tratamiento con ADN libre en células

Fig. 8

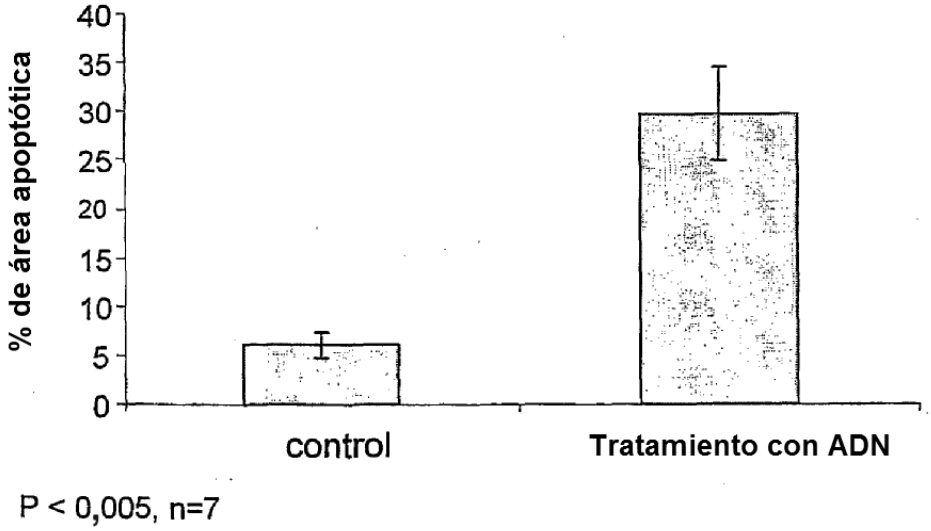

% de área apoptótica
40
35
30
25
20
15
10
5
0
control
Tratamiento con ADN
P < 0,005, n=7

Fig. 9

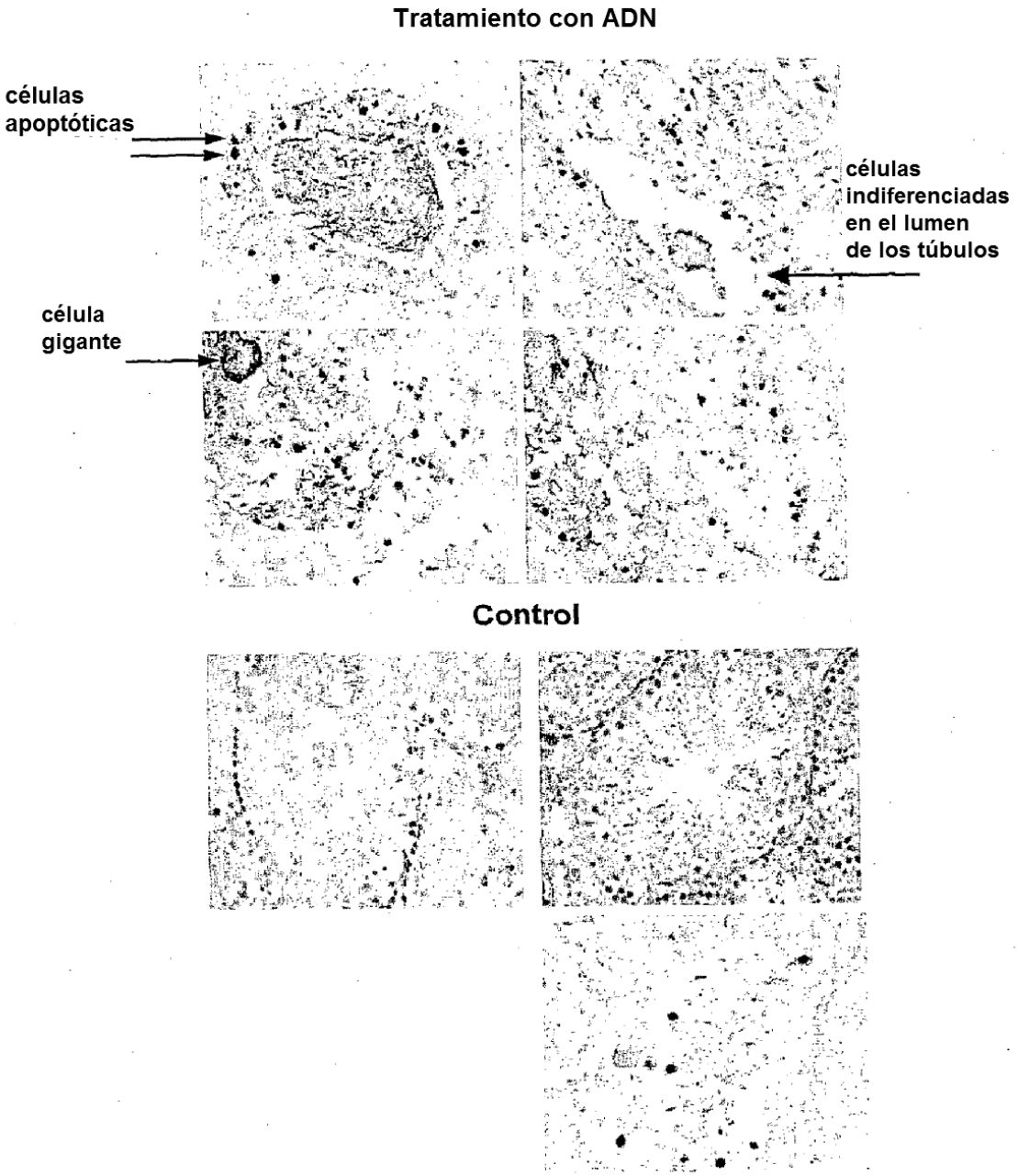
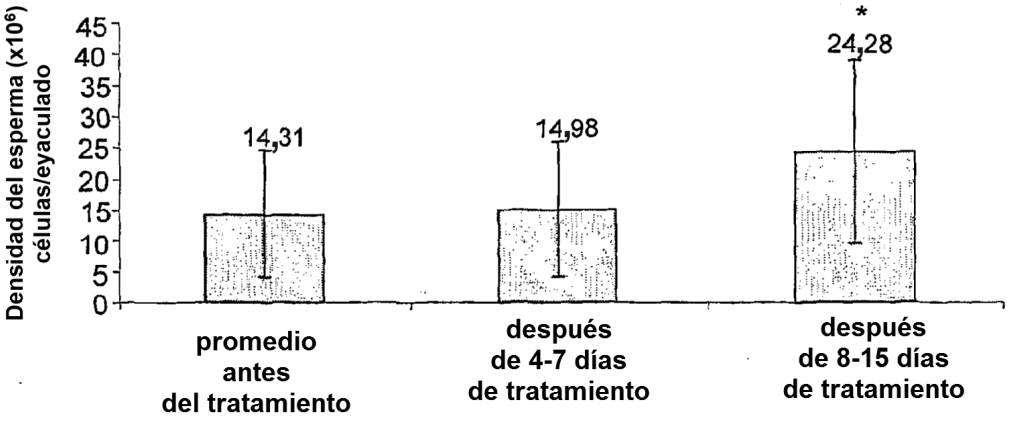

Tratamiento con ADN
células apoptóticas
célula gigante
células indiferenciadas en el lumen de los túbulos
Control

Fig. 10

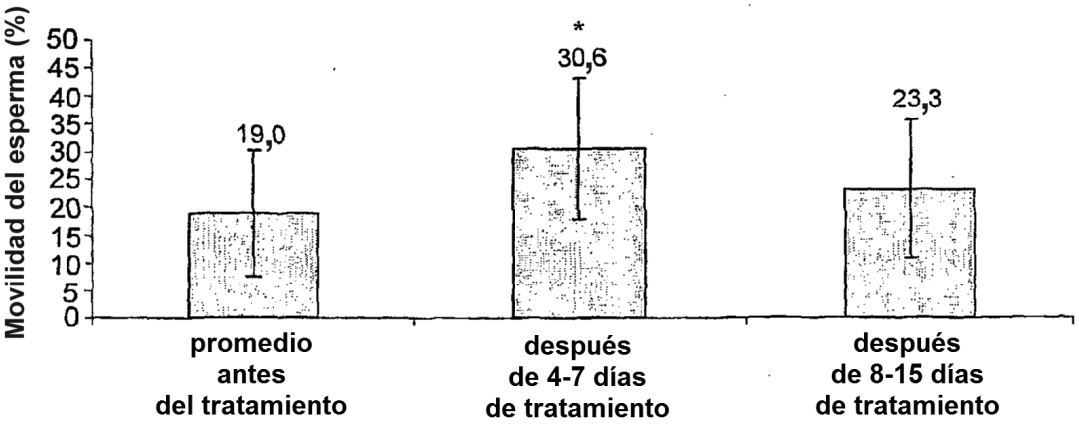
**Efecto de la DNasa sobre la densidad del esperma**




*P =0,079
**Utilizando el ensayo de la t para muestras relacionadas**

Fig. 11

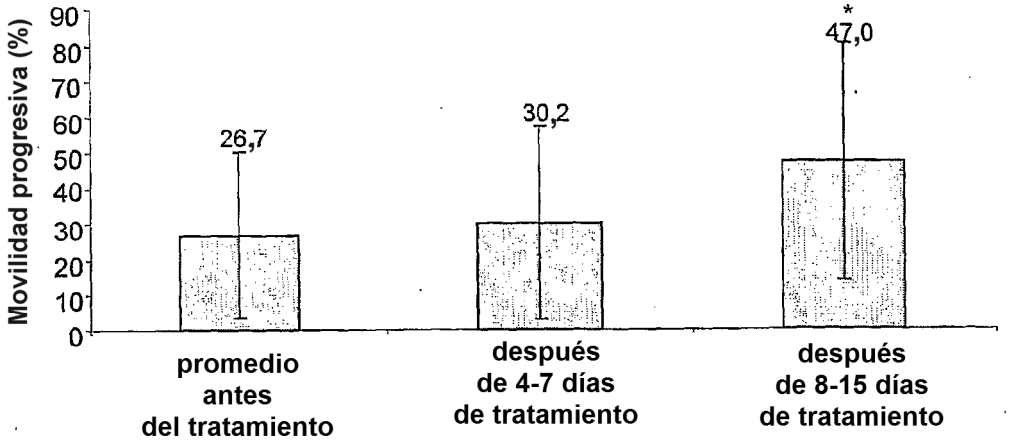
**Efecto de la DNasa sobre la movilidad del esperma**




*P =0,032
**Utilizando el ensayo de la t para muestras no relacionadas**

Fig. 12

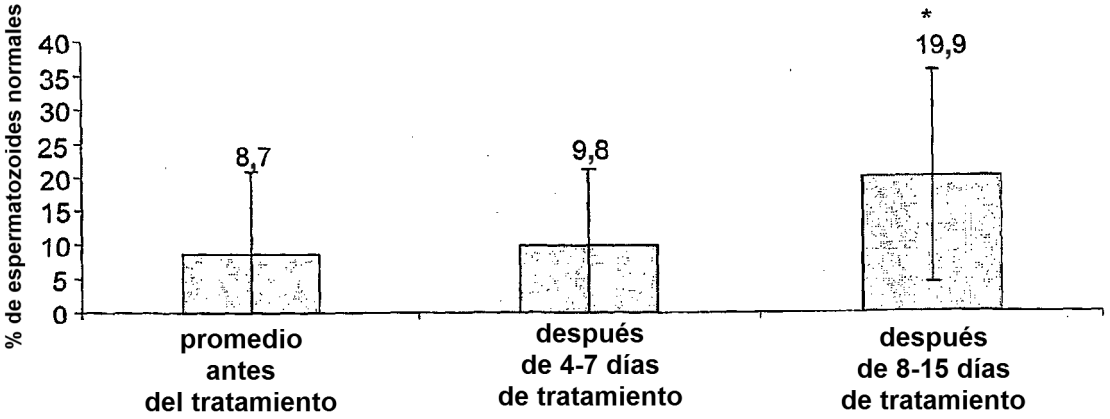
**Efecto de la DNasa sobre la movilidad progresiva del esperma**




*P =0,01
**Utilizando el ensayo de la t para muestras relacionadas**

Fig. 13

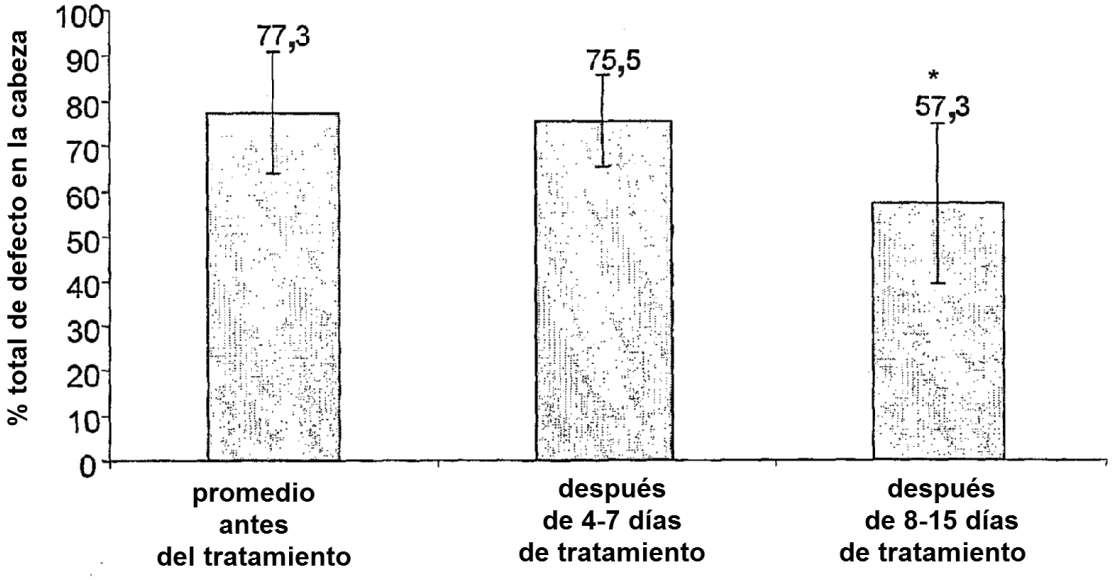
**Efecto de la DNasa sobre el % de espermatozoides normales**




*P =0,098
**Utilizando el ensayo de la t para muestras relacionadas**

Fig. 14

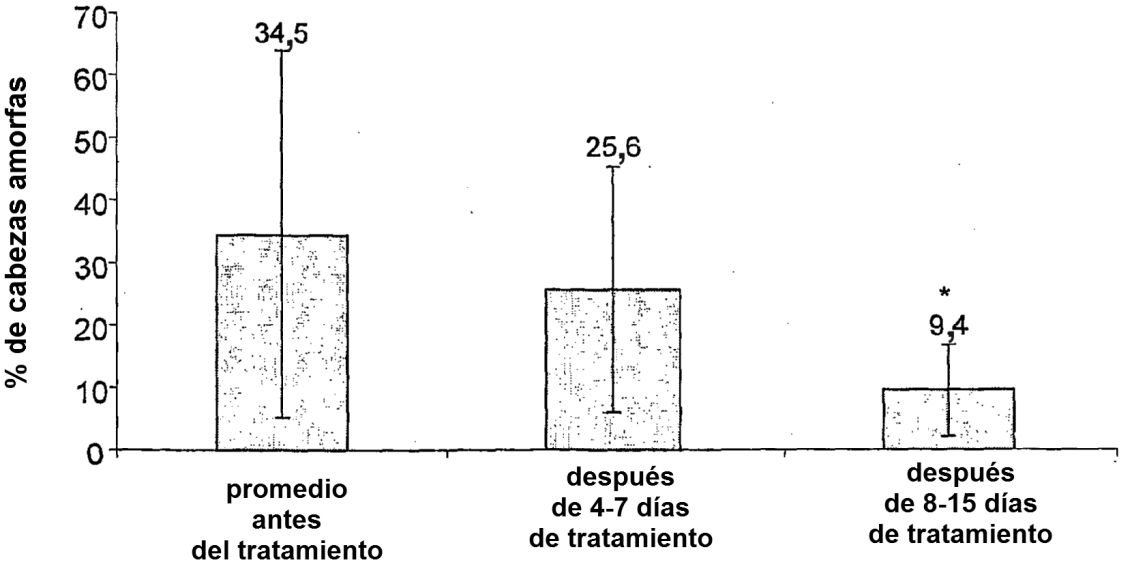
**Efecto de la DNasa sobre malformaciones totales en la cabeza de los espermatozoides**




*P =0,015
Utilizando el ensayo de la t para muestras no relacionadas

Fig. 15

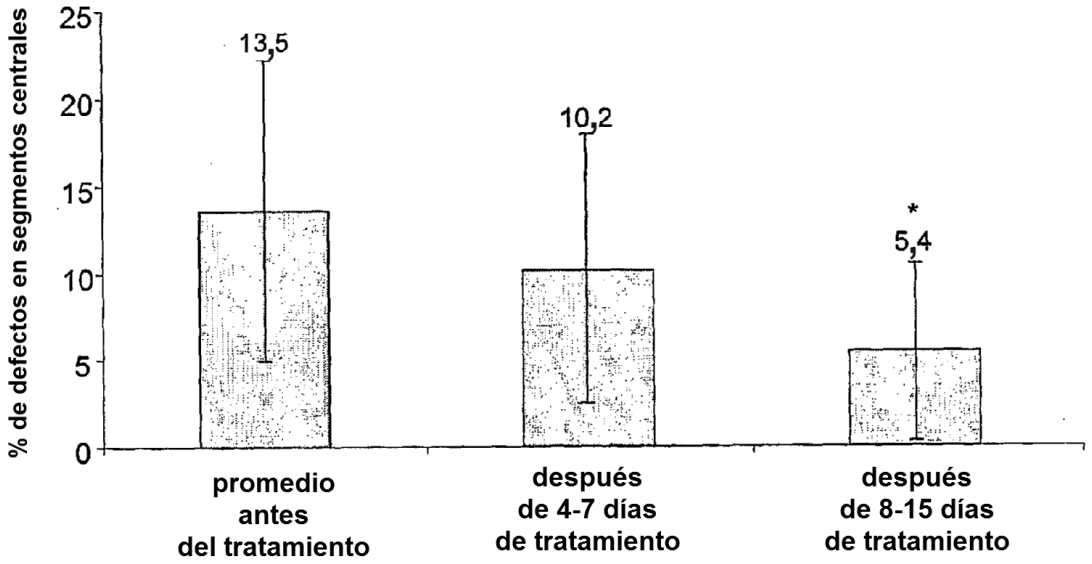
**Efecto de la DNasa sobre malformaciones amorfas en la cabeza de los espermatozoides**




*P =0,043
Utilizando el ensayo de la t para muestras no relacionadas

Fig. 16

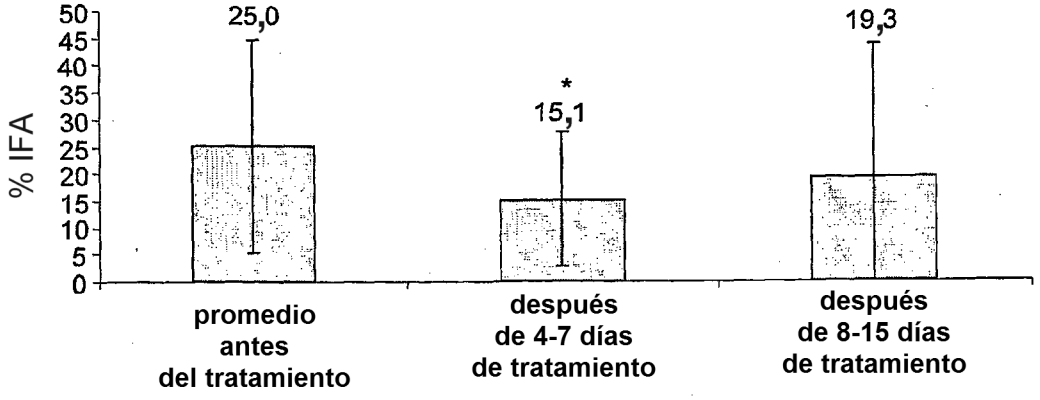
**Efecto de la DNasa sobre malformaciones en el cuello de los espermatozoides**




*P =0,040
Utilizando el ensayo de la t para muestras no relacionadas

Fig. 17

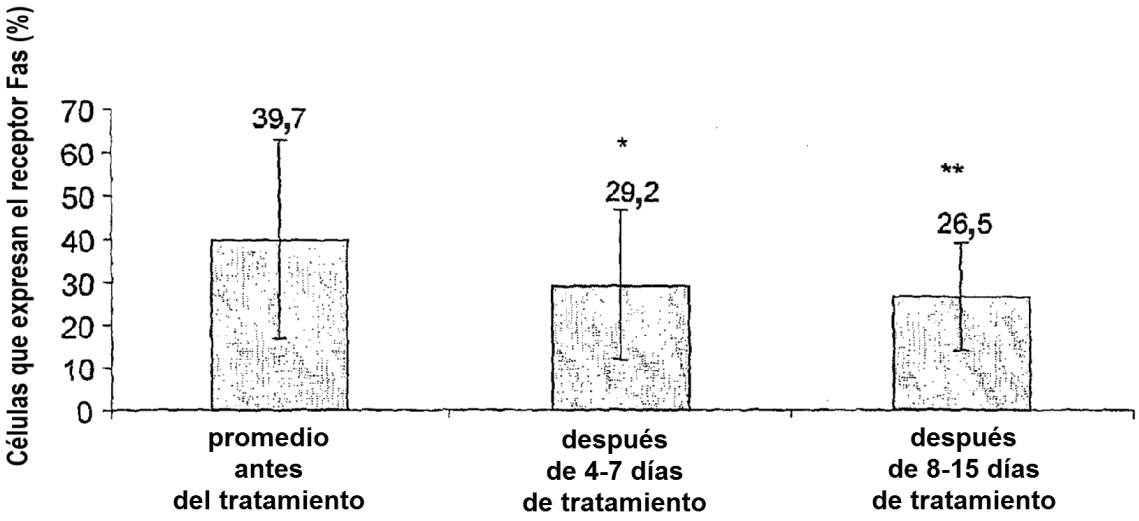
**Efecto de la DNasa sobre la estabilidad de la cromatina en los espermatozoides (EECE)**




*P =0,032
Utilizando el ensayo de la t para muestras relacionadas

Fig. 18

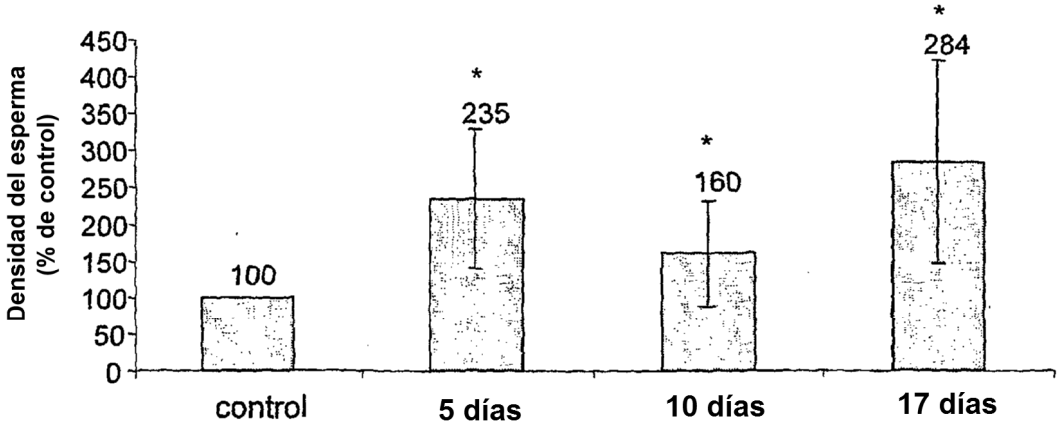
**Efecto de la DNasa sobre la expresión del receptor Fas**




*P =0.009
**P=0.022
Utilizando el ensayo de la t para muestras relacionadas

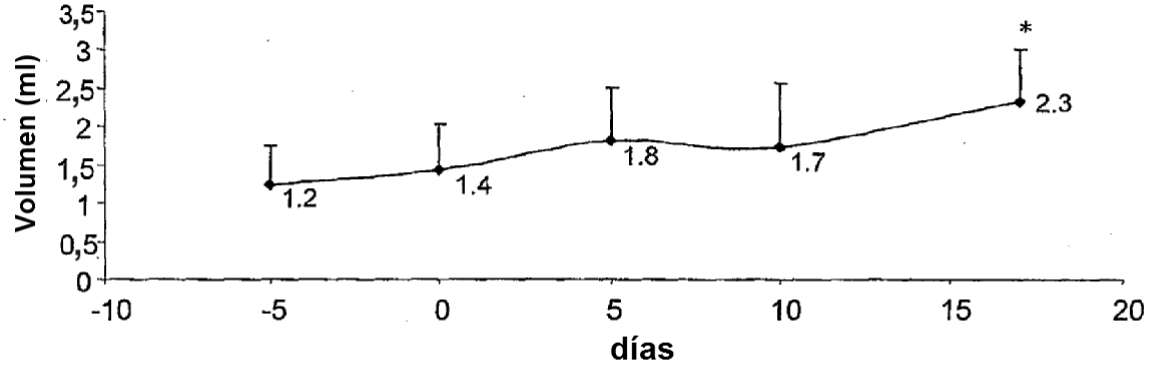
Fig. 19

**Efecto de la DNasa sobre la densidad del esperma**



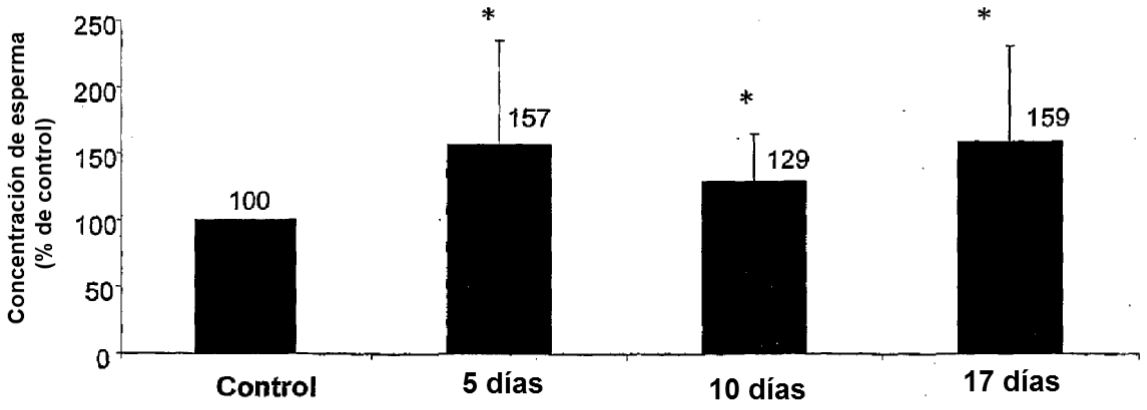

*P <0,005, n=9

Fig. 20



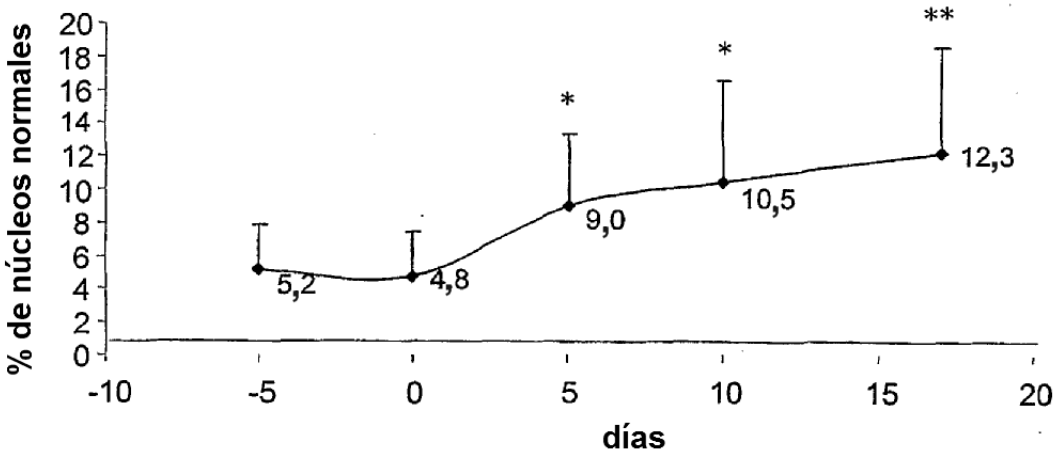

*P <0,001, n=9

Fig. 21



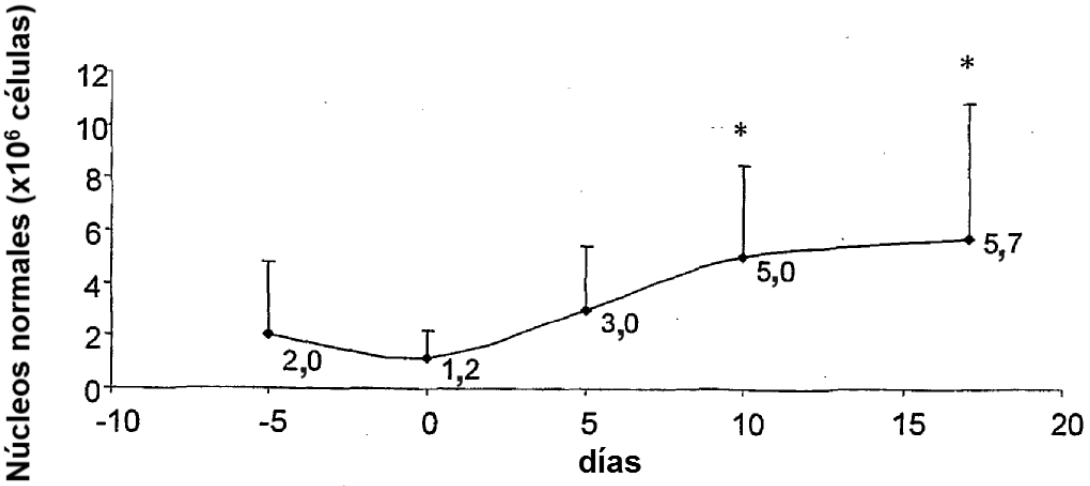

*P <0,05, n=9

Fig. 22



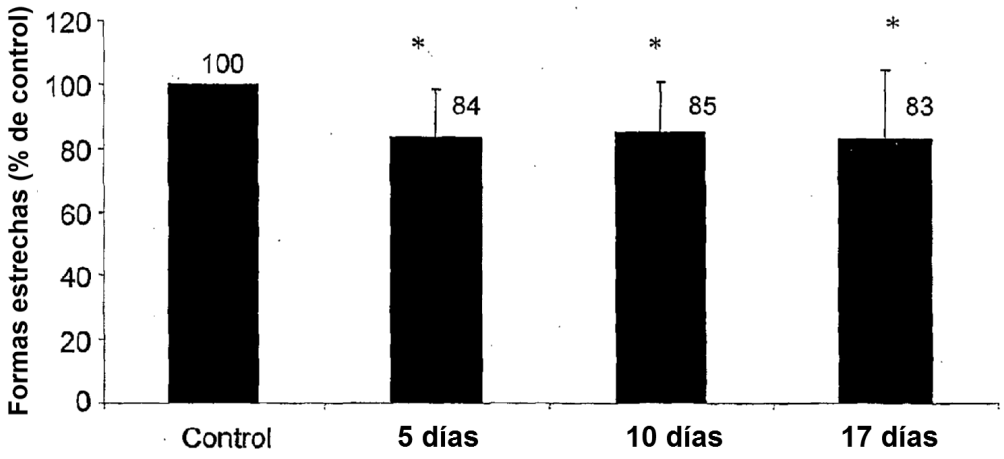

*P <0,05, n=9
**P <0,005, n=9

Fig. 23




*P <0,05, n=9

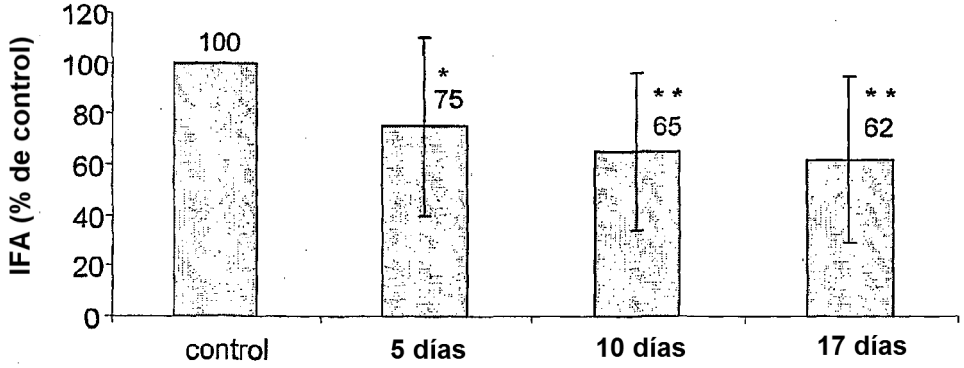
Fig. 24




*P <0,05, n=9

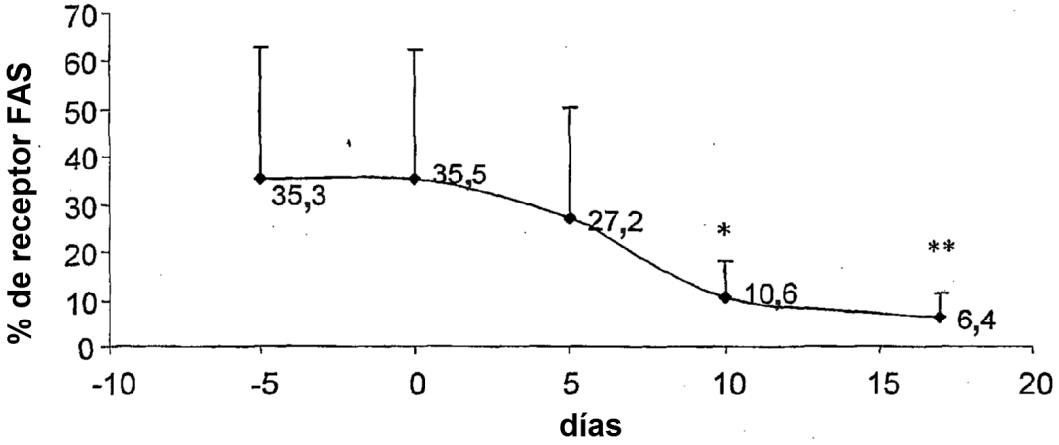
Fig. 25

**Efecto de la DNasa sobre la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides**




*P <0,05, n=9
**P <0,005, n=9

Fig. 26




*P <0,05, n=9
*P >0,005, n=9

Fig. 27

**Efecto de la inhalación de DNasa sobre el % de espermatozoides con núcleos normales**

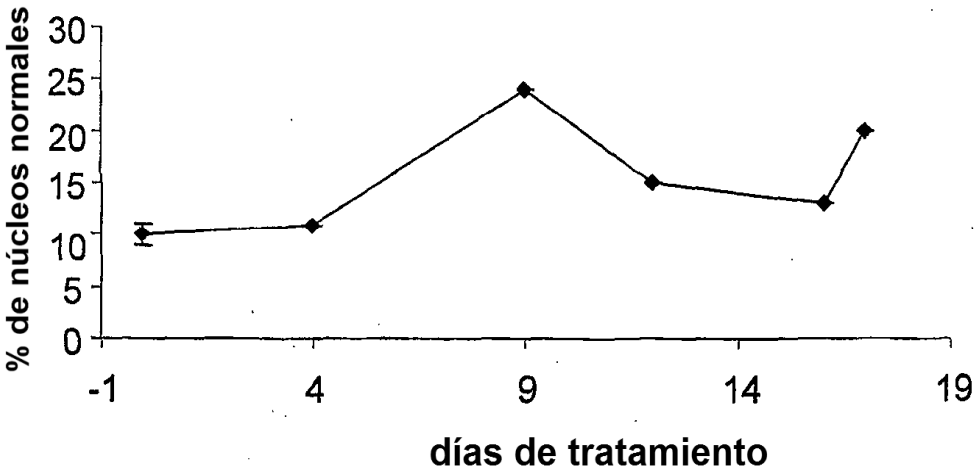
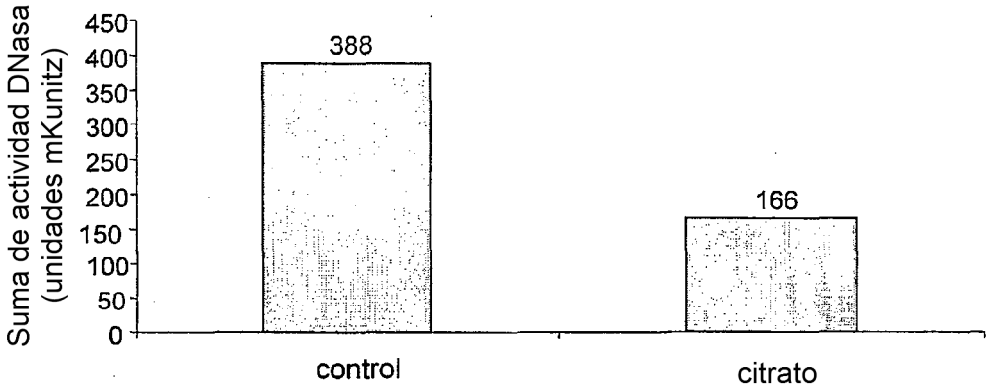



**Fig. 28**

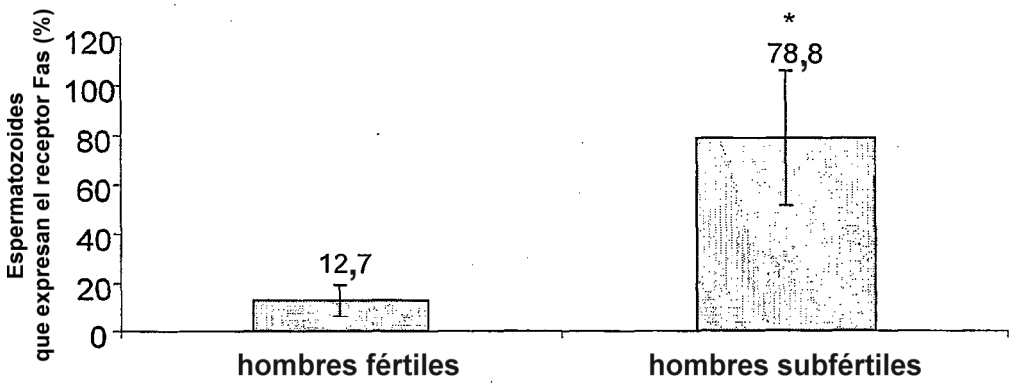
**Efecto del citrato sobre la actividad DNasa endógena en espermatozoides**




Control n=4
Citrato n=2

Fig. 29

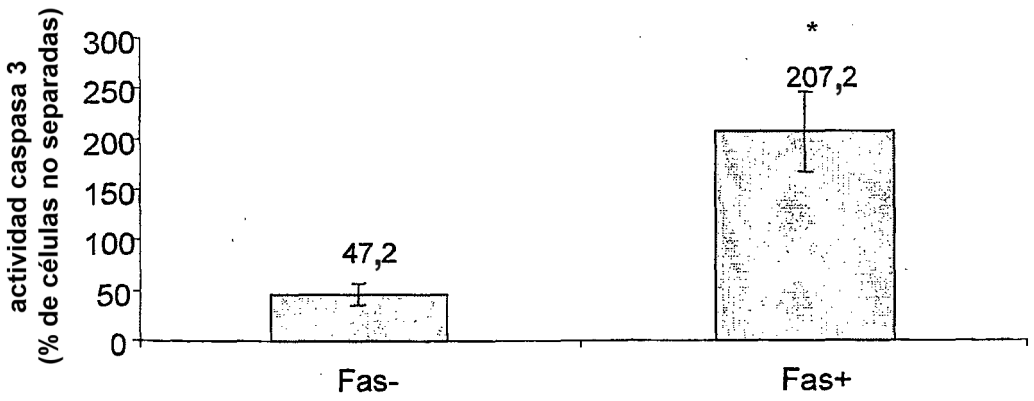
**Expresión del receptor Fas sobre la superficie de espermatozoides de hombres fértiles y subfértiles**




***P<0,01, hombres fértiles n=12, hombres subfértiles n=37**

Fig. 30

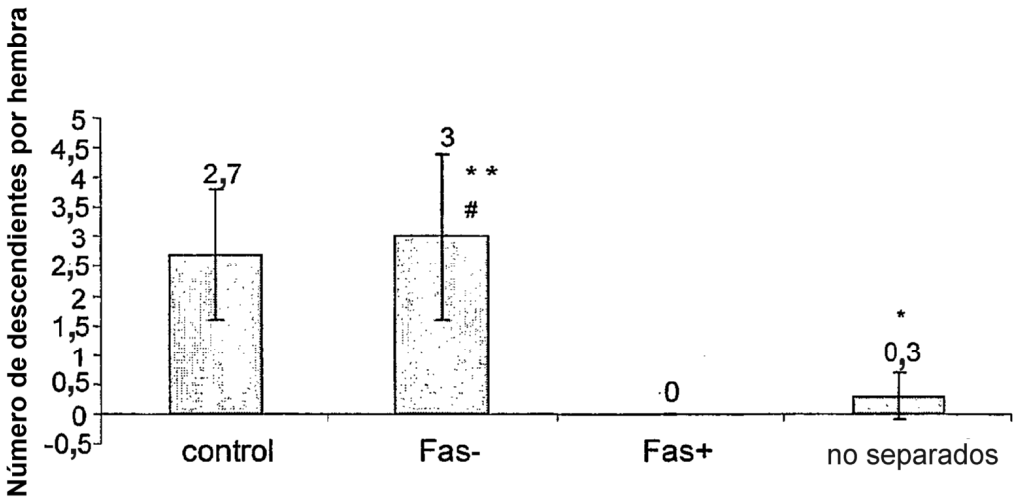
**Actividad de caspasa 3 en espermatozoides positivos y negativos al receptor Fas**




*P <0,001, n=8

Fig. 31

**Correlación entre el número de descendientes y la expresión del receptor Fas**




# P < 0,001 en comparación con espermatozoides no separados
** P < 0,001 en comparación con espermatozoides Fas+
* P < 0,001 en comparación con espermatozoides control

Fig. 32

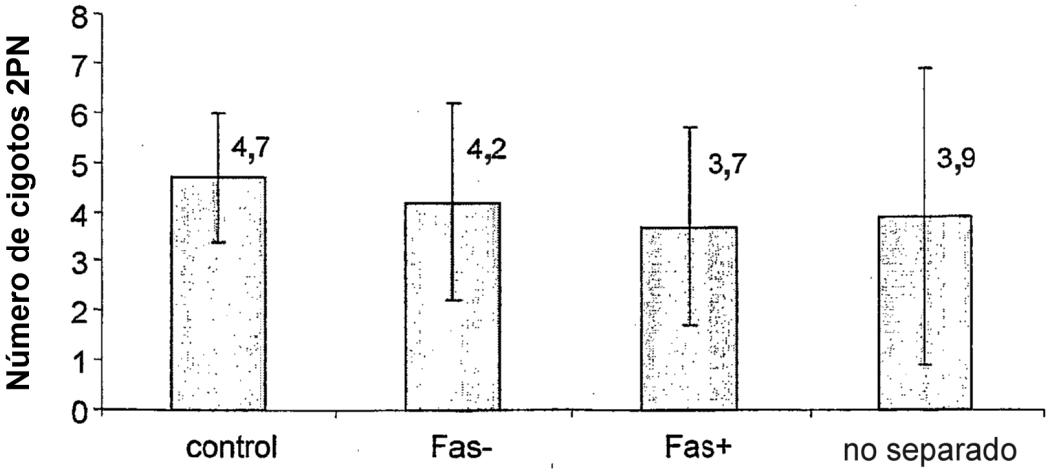



Fig. 33

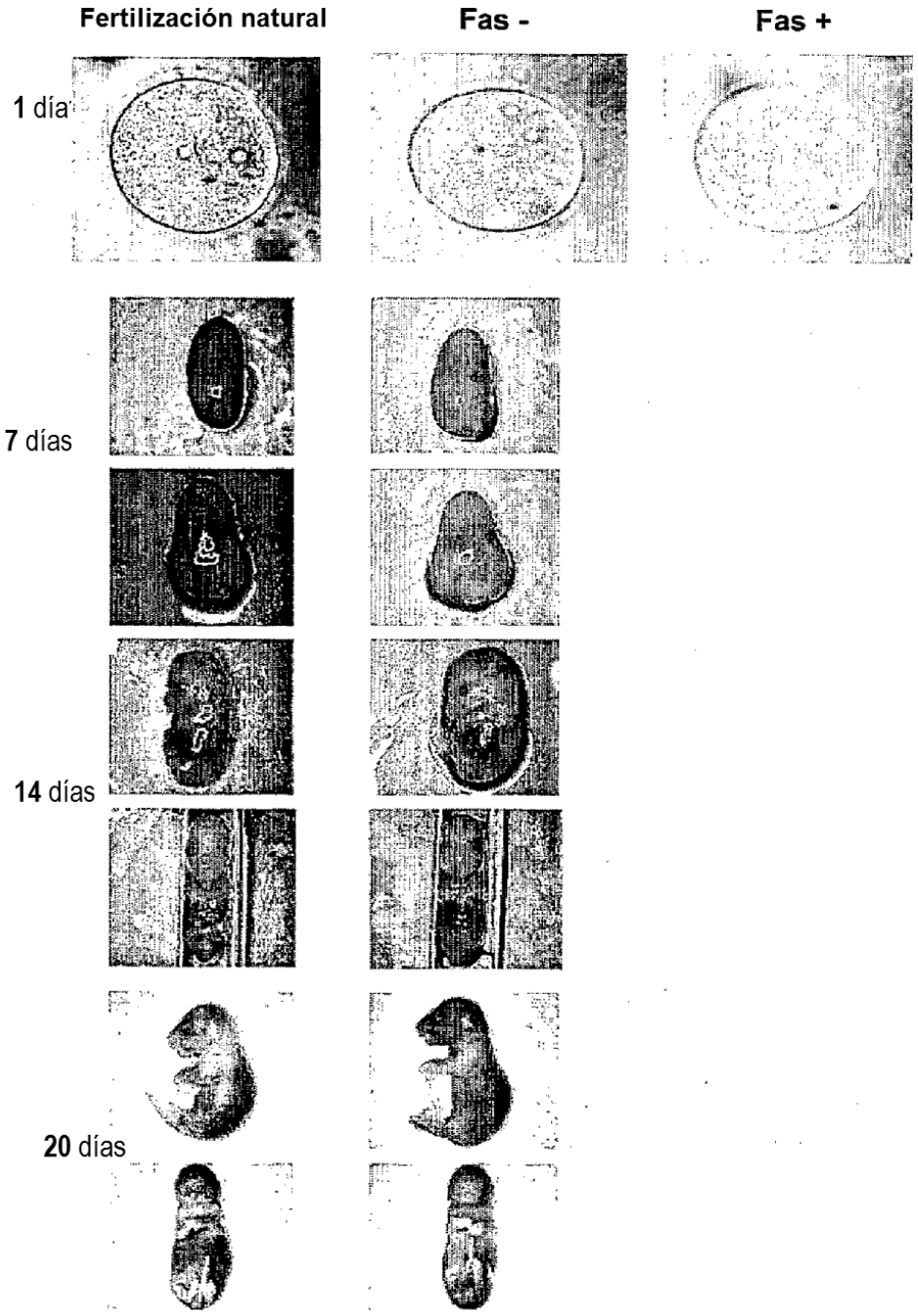
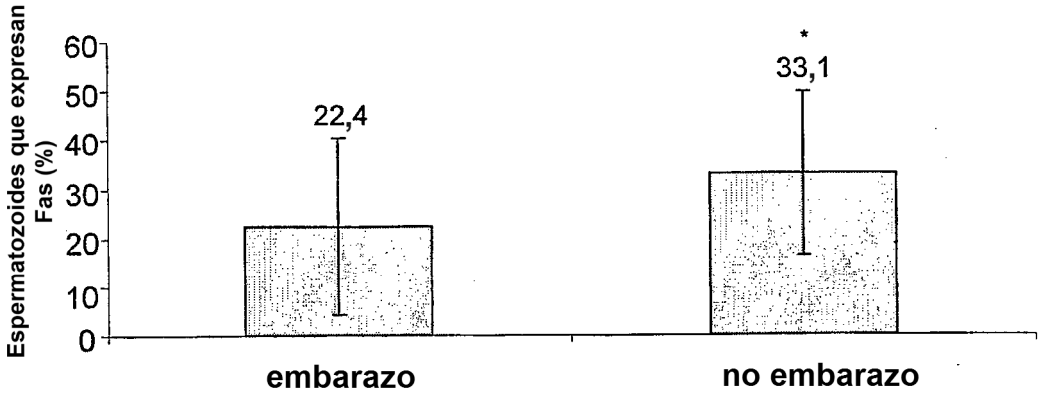



Fig. 34

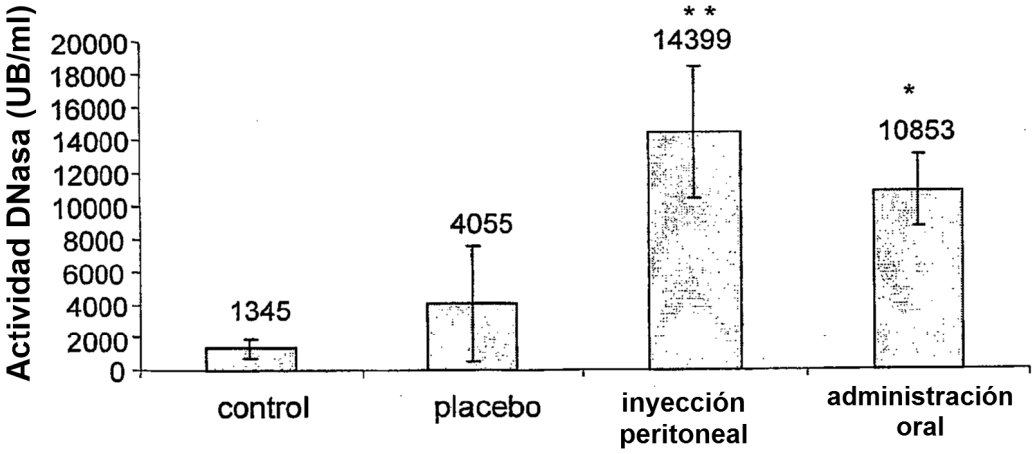
**Expresión del receptor Fas en el semen de hombres subfértiles con éxito o fracaso en un tratamiento IIU**




*P < 0,027

Fig. 35

**Actividad DNasa en la sangre de ratones**




* P <0,001 en comparación con el control, n=6
** P <0,001 en comparación con el control y placebo

Fig. 36