



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia**

Noemia Aparecida Partelli Mariani

**Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de
camundongos: identificação, expressão e potenciais papéis
fisiológicos**

**Botucatu-SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Noemia Aparecida Partelli Mariani

**Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de
camundongos: identificação, expressão e potenciais papéis
fisiológicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Biotecnologia do Instituto
de Biociências de Botucatu
Candidata: Noemia A. Partelli Mariani

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva
Co-orientadora: Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

**Botucatu-SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mariani, Noemia Aparecida Partelli.

Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos : identificação, expressão e potenciais papéis fisiológicos / Noemia Aparecida Partelli Mariani. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Erick José Ramo da Silva
Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos
Capes: 21005001

1. Espermatozoides. 2. Anticoncepcionais. 3. Proteínas - Pesquisa. 4. Rato como animal de laboratório - Pesquisa.

Palavras-chave: EPPIN; Espermatozoide; Proteínas.

Auxílio Financeiro

FAPESP

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)
Processos #2015/08227-0; #2016/23025-7 e #2017/11363-8

“A gente só encanta quando se encanta. Se eu não estiver encantado com o meu objeto de conhecimento, eu não posso encantar o outro.”

Mario Sergio Cortella

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar todo o meu caminho.

A minha mãe Jucilene Partelli Mariani e meu pai Dirceu Antônio Mariani que me apoiaram desde o início, sempre me acalmaram nos dias difíceis que foram muitos e por fazerem tudo o que podem e até o que não podem por mim. Vocês são meus tesouros!

A minha irmã Isadora Partelli Mariani por sempre acreditar em mim e me alegrar com o seu amor. Te amo muito!

A todos os meus familiares (primos, tios e avós) pelo incentivo, em especial as minhas Tias Palma e Rosilan Mariani.

Ao meu namorado Lucas Santos Satiro pela paciência em me aturar nos momentos de estresse e preocupação, pelo apoio, companheirismo e palavras de conforto. Você é o meu amor!

A minha sogra Valéria Santos pelo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos de Alfredo Chaves, Alegre e Botucatu por permanecerem na minha vida proporcionando lindos momentos e companheirismo. Em especial agradeço a Tayssa Grassi, Michelle Denadai, Paola Dias, Sofia Munaldi, Geovana Cavallini, Débora Bertholdi, Isabela Bertholdi, todos amigos da turma IV de Farmácia da UFES, Ediléia Souza, Letícia Polônio, Gabriela Zochio, Jessica Sabatine, Mayara Dias, Naiara Costa, José Sérgio Possomato e Katiussia Alves.

Aos meus queridos amigos Tamiris Rocha Fanti Raimundo, Juliana de Jesus Andrade, Aline Contri, Alexandre Dorth Andrade, Alan Andrew dos Santos Silva, André Mueller, Priscila Almeida, Leonardo Rokina, Renan Mori, Anna Gabryanczyk e Georgia Pereira que me ajudaram no decorrer do meu projeto e proporcionaram bons momentos de pesquisa e risadas.

A minha amiga Thamiris Figueiredo por todos os bons momentos, conselhos e companheirismo. Você apareceu na hora certa na minha vida!

Ao meu orientador Erick José Ramo da Silva por sempre acreditar em mim e no meu potencial, por todos os ensinamentos, críticas construtivas, apoio e principalmente por me mostrar que podemos sempre melhorar e crescer cada vez mais. O senhor é inspirador!

A minha co-orientadora Lucilene Delazari dos Santos por todos os ensinamentos e apoio no decorrer do projeto.

A professora Maria Christina Werneck Avellar e seus alunos: Lucas Garcia, Geanne Freitas e Samuel Fernandes pelas colaborações e aprendizados desenvolvidos no Instituto de Farmacologia da UNIFESP.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, que contribuíram grandemente para a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Janete, Ana Cristina Murcia de Souza (Cris), Paulo Cesar Mioni, Luís A. de Oliveira e em especial ao Hélio Kushima, pela ótima convivência, suporte e auxílio no que eu precisei.

A todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia que me ajudaram na realização de experimentos.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho e com a minha formação.

A todo o suporte dado pelo Instituto de Biociências de Botucatu e do departamento de Farmacologia.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação e defesa de mestrado por toda contribuição ao trabalho e discussões científicas.

Aos professores Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Rafael Henrique Nobrega por permitirem o uso dos microscópios para as análises dos experimentos de imuno-histoquímica e imunofluorescência.

Ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC) pela colaboração nos ensaios de espectrometria de massas.

À Fapesp pelo apoio de bolsa de estudo e auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

A EPPIN (do inglês, *Epididymal peptidase inhibitor*), proteína antimicrobiana rica em resíduos de cisteína contendo duas sequências consenso de domínios de inibidores de protease do tipo WFDC e Kunitz, é um alvo farmacológico para o desenvolvimento de novos contraceptivos masculinos devido ao seu papel crítico na motilidade do espermatozoide. O desenvolvimento de fármacos contraceptivos baseados nas funções da EPPIN requer um entendimento mais profundo a respeito dos seus mecanismos fisiológicos e posterior avaliação da eficácia e segurança da potencial droga em modelos pré-clínicos. No presente estudo, investigamos o perfil de expressão da EPPIN em tecidos e em espermatozoides testiculares e epididimários de camundongos e identificamos potenciais proteínas que interagem com a EPPIN no espermatozoide maduro. Para caracterizar o perfil de expressão da EPPIN, processamos órgãos reprodutivos e não-reprodutivos, além de espermatozoides para ensaios de RT-PCR, qPCR, *Western blot* e imuno-histoquímica/imunofluorescência. Para a identificação dos parceiros de ligação da EPPIN, coletamos espermatozoides do corpo/cauda do epidídimo e incubamos as células com a fração solúvel em tampão fosfato do fluido da glândula seminal dos mesmos animais. Realizamos ensaios de co-imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-EPPIN Q20E ou IgG de coelho (controle negativo) para imunoprecipitar a EPPIN e co-imunoprecipitar suas proteínas parceiras, processamos as amostras para digestão de proteínas com tripsina e identificamos os peptídeos trípticos por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Nossos resultados mostraram que a expressão da EPPIN (RNAm e proteína) é dependente do nível de andrógenos, abundantemente expressa no testículo e epidídimo, mas também presente no ducto deferente, glândula seminal e glândula adrenal de camundongos. Observamos também imunomarcagem positiva para a EPPIN na região acrossômica e flagelo de espermatozoides epididimários, sugerindo potenciais ações na reação acrossômica e motilidade espermática. A co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN e posterior análise por LC-MS/MS e *Western blot* utilizando espermatozoides epididimários maduros pré-incubados com fluido da glândula seminal revelou que as proteínas SVS2, SVS3a, SVS5 e SVS6 secretadas pela glândula seminal são potenciais proteínas de interação da EPPIN na superfície do espermatozoide. Realizamos ensaios de *Western blot* das amostras obtidas nos ensaios de co-imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-EPPIN, anti-SVS2 e anti-SVS3 para confirmação dos resultados e ensaios de *Far-Western blot* com as proteínas EPPIN e SVS2 recombinantes para investigar a potencial interação proteica. Esses dados sugerem que a EPPIN é uma proteína que atua em complexos proteicos na superfície do espermatozoide de camundongos. Nossos resultados fornecem novas informações sobre os papéis fisiológicos da EPPIN em machos e destacam sua importância para interações proteína-proteína no espermatozoide, as quais podem proteger e preparar o gameta masculino durante sua jornada pelo sistema reprodutor feminino e facilitar o processo de fertilização. Além disso, nossos dados sustentam a viabilidade do camundongo como modelo experimental adequado para estudar as funções e mecanismos fisiológicos da EPPIN, bem como para o avanço no seu desenvolvimento como alvo farmacológico para contracepção masculina.

ABSTRACT

EPPIN (Epididymal peptidase inhibitor), a cysteine-rich antimicrobial protein containing both Kunitz and whey acidic protein (WAP)-type four disulfide core protease inhibitor consensus sequences, is a target for the development of new male contraceptive drugs due to its critical role in sperm motility. The development of contraceptive drugs based on EPPIN functions requires a deeper understanding on its physiological roles and further evaluation of efficacy and safety of the potential drug with preclinical models. Herein, we investigated the expression profile of EPPIN in tissues and in spermatozoa from testis and epididymis and identified potential proteins that interact with EPPIN in mature sperm. To characterize the expression profile of EPPIN, we processed reproductive and non-reproductive organs, as well as spermatozoa for RT-PCR, qPCR, Western blot and immunohistochemistry/immunofluorescence assays. For the identification of potential EPPIN's partners, we collected spermatozoa from the corpus/cauda epididymis and incubated them with the phosphate-soluble fraction of seminal vesicle fluid from the same animals. Then, we performed co-immunoprecipitation assays using anti-EPPIN Q20E antibody or rabbit IgG (negative control) to immunoprecipitate EPPIN and co-immunoprecipitate its partner proteins, processed samples for trypsin protein digestion and identified tryptic peptides by mass spectrometry (LC-MS/MS). Our results showed that the *Eppin* is an androgen-dependent gene, abundantly expressed in the testis and epididymis, but also present in the vas deferens, seminal vesicle and adrenal gland of mice. We observed EPPIN-positive immunostaining in the acrosomal region and flagellum of epididymal spermatozoa, suggesting potential actions of EPPIN in the acrosome reaction and sperm motility. Co-immunoprecipitation with anti-EPPIN antibody and analysis by LC-MS/MS and Western blot using mature epididymal spermatozoa pre-incubated with seminal vesicle fluid revealed that the SVS2, SVS3a, SVS5 and SVS6 are potential interaction proteins of EPPIN in the sperm surface. We performed Western blot assays of the samples obtained from co-immunoprecipitation assays using anti-EPPIN, anti-SVS2 and anti-SVS3 antibodies to confirm the co-immunoprecipitation of SVS2 and SVS3, and Far-Western blot assays with recombinant EPPIN and SVS2 to further investigate their interaction. Our data suggest that EPPIN is a protein that acts as a hub for the interaction of SVS proteins in mouse spermatozoa. In addition, our results provide new insights into the physiological roles of EPPIN in males and highlight its importance for protein-protein interactions in the spermatozoon, which can protect and prepare the male gamete during its journey through the female reproductive system and facilitate the fertilization process. Thus, our data provide support for the use of the mouse as an experimental model to study physiological functions and mechanisms of EPPIN, as well as its further development as a contraceptive drug target.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ET: enantato de testosterona

UT: endecanoato de testosterona

DMAU: undecanoato de dimetandrolona

DMA: dimetandrolona

AR: receptores de andrógenos

PR: receptores de progesterona

SACH: isômero (S) α -cloridrina

CatSpers: canais de cátions dos espermatozoides

NHEs: *Na⁺/H⁺ exchanger*, do inglês

EPPIN: Inibidor de protease epididimário

WFDC: whey acidic protein-type four disulfide core gene family, do inglês

Clu: clusterina

LTF: lactotransferrina

SEMG1: semenogelina-1

PSA: antígeno prostático específico

Ppia: ciclofilina A

Rps18: proteína ribossomal S18

BSA: albumina de soro bovina

TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês

SVS3a: seminal vesicle secretory protein 3a, do inglês

SVS5: seminal vesicle secretory protein 5, do inglês

SVS6: seminal vesicle secretory protein 6, do inglês

GADPS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase espermática

VDAC2: proteína 2 do canal seletivo de ânions dependente de voltagem

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1. Métodos hormonais para contracepção masculina.....	10
1.2. Métodos não hormonais para contracepção masculina.....	12
1.3. O espermatozoide.....	15
1.4. Proteínas espermáticas como alvos para contracepção masculina.....	18
1.5. EPPIN.....	19
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. Material e métodos.....	38
3.1. Estratégias Experimentais.....	38
3.2. Anticorpos.....	39
3.3. Animais e coleta dos órgãos.....	40
3.4. Extração do RNA total.....	41
3.5. Reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia convencional (PCR).....	42
3.6. Ensaios de PCR em tempo real (qPCR).....	43
3.7. Ensaios de imuno-histoquímica.....	44
3.8. Ensaios de Imunofluorescência.....	46
3.9. Ensaios Western blot.....	47
3.10. Ensaios de co-imunoprecipitação.....	48
3.11. Digestão enzimática das proteínas em solução.....	50
3.12. Sequenciamento peptídico espectrometria de massas.....	51
3.13. Análise dos dados de espectrometria de massas.....	51
3.14. Ensaios Far Western blot.....	51
3.15. Análise estatística.....	53
4. Resultados.....	56
4.1 - Capítulo 1: Perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em tecidos e no espermatozoide de camundongos.....	56
4.1.1 A EPPIN é diferencialmente expressa em tecidos reprodutivos de camundongos machos adultos.....	56
4.1.2 A EPPIN é expressa por células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica no testículo e células epiteliais no epidídimo de camundongos machos adultos.....	59
4.1.3 A EPPIN é expressa nas células epiteliais da glândula seminal e nas células do córtex e medula da glândula adrenal.....	61

4.1.4 A imunolocalização da EPPIN no espermatozoide murino sofre alterações durante o seu trânsito do testículo até a cauda do epidídimo.....	63
4.1.5 A maturação sexual exerce impacto positivo na expressão da EPPIN no testículo, epidídimo e glândula seminal de camundongos	65
4.2 Capítulo 2: Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos.....	70
4.2.1 A EPPIN murina presente na superfície do espermatozoide possui proteínas parceiras oriundas do fluído da glândula seminal e do próprio espermatozoide.....	70
5. Discussão	80
5.1. Perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em tecidos e no espermatozoide de camundongos	80
5.2. Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos.....	85
6. Conclusão.....	89
7. Referências.....	91
8. Material Suplementar	106
ANEXO I	112
ANEXO II	113
ANEXO III	114
ANEXO IV.....	116

Introdução

1. Introdução

Em diversos países, as mulheres ainda lidam com gestações imprevistas para elas e seus parceiros (SEDGH; SINGH; HUSSAIN, 2014). Nos últimos anos, o tempo que uma mulher gasta para evitar uma gravidez aumentou drasticamente, principalmente por causa da urbanização e do desenvolvimento socioeconômico (SEDGH; SINGH; HUSSAIN, 2014). Essa situação é decorrente sobretudo devido ao fato de que são as mulheres que carregam o fardo da contracepção moderna. Vale ressaltar que, em escala mundial, aproximadamente 40% das 215 milhões de gestações que ocorrem anualmente não são planejadas pelos casais (SEDGH; SINGH; HUSSAIN, 2014). Dentre essas gestações, quase metade é finalizada por procedimentos de aborto induzido, e, portanto associadas a uma série de desfechos negativos de saúde, econômicos, sociais e psicológicos para mulheres e crianças (HARDEE *et al.*, 2004; LOGAN *et al.*, 2007; GIPSON; KOENIG; HINDIN, 2008; TSUI; MCDONALD-MOSLEY; BURKE, 2010).

Prevenir gravidezes não-planeadas pode evitar aproximadamente um quarto das mortes maternas, incluindo aquelas que resultam de procedimentos de aborto indevido (UNITED NATIONS, 2006). Dessa forma, ações de promoção de planejamento familiar, como melhorar ou aumentar o acesso a métodos contraceptivos, são importantes para reduzir a frequência de aborto, evitar as graves consequências de saúde física e mental (WHO, 2011; SEDGH; SINGH; HUSSAIN, 2014) e ainda permitir ao casal a escolha de ter ou não filhos. Além disso, é reconhecido que aumentar a oferta de métodos contraceptivos para a população poderá subsidiar um melhor planejamento familiar, qualidade de vida e também contribuir diretamente na saúde reprodutiva dos casais (AITKEN *et al.*, 2008).

Mais especificamente, há uma maior demanda pelo desenvolvimento de métodos contraceptivos masculinos para controle da natalidade, cujas opções atuais são limitadas ao preservativo ou à vasectomia, sendo que destes apenas o primeiro é de uso imediato, reversível, porém associado a alto índice de falhas do ponto de vista da contracepção. Vale ressaltar que apesar das poucas opções, métodos contraceptivos masculinos representam uma parcela significativa das escolhas contraceptivas dos casais (MARTIN *et al.*, 2000;

ROTH; AMORY, 2016), principalmente nos casos em que as parceiras se enquadram nos grupos de riscos para o uso de “pílulas” hormonais. Nesse contexto, estratégias farmacológicas para contracepção masculina são interessantes, pois têm o potencial de suprimir a fertilidade do homem de forma temporária, segura e efetiva (ROTH; AMORY, 2016). No cenário atual dos estudos em Farmacologia da Contracepção, diferentes estratégias farmacológicas hormonais e não-hormonais que promovem bloqueio reversível da fertilidade masculina, por inibição da espermatogênese ou da função espermática, estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico (ROTH; AMORY, 2016).

1.1. Métodos hormonais para contracepção masculina

Os métodos contraceptivos masculinos hormonais dependem da inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal via administração exógena de antagonistas dos seus receptores ou de andrógenos em conjunto ou não com progestinas, ocasionando inibição reversível da esteroidogênese testicular e da espermatogênese (CHAO; PAGE; ANDERSON, 2014; PIOTROWSKA *et al.*, 2017).

Os ésteres de testosterona enantato de testosterona (ET) e undecanoato de testosterona (UT) são exemplos de drogas androgênicas que foram utilizadas em alguns estudos em Farmacologia da Contracepção. A administração injetável de 200 mg de ET semanalmente durante 6 meses ocasionou azoospermia em 65% dos homens com 4 meses de uso (WHO, 1990). Em adição, 75% dos homens tiveram contagem espermática inferior a 3 milhões de espermatozoides/ml e apenas uma gravidez ocorreu quando casais utilizaram somente a administração desse composto como método contraceptivo (WHO, 1990). Outros estudos verificaram os efeitos contraceptivos da administração de UT em homens saudáveis. Um estudo realizado na China utilizando doses mensais de 500 ou 1000 mg de UT verificou a ocorrência de azoospermia em 11 dos 12 homens no grupo de 1000 mg (ZHANG *et al.*, 1999). Posteriormente outro estudo Chinês avaliou os efeitos do tratamento com 500 mg de UT após uma dose única de 1000 mg. Este tratamento resultou em 43% de

homens com azoospermia e apenas 3% dos homens mantiveram a contagem de espermatozoides acima de 3 milhões/ml (GU *et al.*, 2003).

Ao comparar a administração de andrógenos isoladamente com a sua associação com progestágenos foi detectado que a formulação contendo ambos compostos é capaz de suprimir a espermatogênese de 80-95% da população masculina; em contrapartida, somente cerca de 50% dos homens que receberam andrógenos isoladamente alcançaram os mesmos resultados (GU *et al.*, 2003; TURNER *et al.*, 2003; MOMMERS *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2009; PIOTROWSKA *et al.*, 2017). Em um estudo, o levonorgestrel (500 mg por dia) em combinação com ET (100 mg por via intramuscular por semana) durante seis meses, causou 67% de azoospermia e 94% dos homens apresentaram concentrações de espermatozoides inferiores a 1 milhão/ml, enquanto a administração de testosterona isoladamente resultou em taxas de 33% de azoospermia e somente 61% dos homens com concentrações de espermatozoides inferiores a 1 milhão/ml (BEBB *et al.*, 1996).

Dessa forma, a baixa eficácia de preparações contendo somente androgênios em sua composição promoveu um maior interesse em desenvolver formulações contendo ambos compostos: androgênios e progestágenos. O undecanoato de dimetandrolona (DMAU) é um composto que após administração sofre conversão à dimetandrolona (DMA), sua forma ativa que se liga tanto a receptores de andrógenos (AR) como a receptores de progesterona (PR) (ATTARDI; HILD; REEL, 2006). Doses diárias de DMAU foram capazes de diminuir os níveis de testosterona e gonadotrofinas séricas em quantidades que são consideradas eficientes para um contraceptivo (ATTARDI; HILD; REEL, 2006). Em contrapartida também foram relatados quadros de ganho de peso, aumento do hematócrito, redução de colesterol HDL, relatos de acne e diminuição da libido (ATTARDI; HILD; REEL, 2006). Outro estudo demonstrou que a administração diária de DMAU por 28 dias em homens saudáveis foi capaz de suprimir acentuadamente os níveis séricos de testosterona, LH e FSH. Todavia, efeitos indesejados como variações no peso, no hematócrito, nos níveis séricos de colesterol LDL e no desejo sexual desses indivíduos também foram relatados (THIRUMALAI *et al.*, 2019).

Em adição, Behre e colaboradores (BEHRE *et al.*, 2016) verificaram supressão reversível da concentração de espermatozoides para níveis inferiores a 1 milhão/mL em 24 semanas de injeção intramuscular de 200 mg de ET combinado com 1000 mg de UT, administrado a cada 8 semanas. No entanto, diversos eventos adversos como acne, dor no local da injeção, aumento da libido e distúrbios do humor também foram relatados. Seguindo a recomendação de um comitê externo de revisão de segurança, as injeções foram canceladas.

1.2. Métodos não hormonais para contracepção masculina

O crescente arsenal de inovações tecnológicas tem auxiliado no entendimento da fisiologia reprodutiva humana e também na expressão de genes/proteínas específicas do sistema genital masculino (MELÉ *et al.*, 2015; UHLÉN *et al.*, 2015; YOUNG *et al.*, 2018). Além disso, a utilização de ensaios *in silico* como forma complementar à avaliação de potenciais papéis e interações entre alvos específicos baseados principalmente em sua estrutura tem facilitado ainda mais a seleção de possíveis alvos contraceptivos masculinos (IRWIN *et al.*, 2009; YOO *et al.*, 2015; YOUNG *et al.*, 2018). Abordagens não-hormonais para a contracepção masculina estão diretamente relacionadas a eventos associados à história natural do espermatozoide, que ocorrem desde sua produção até a passagem pelo epidídimo e posterior ejaculação. Dessa forma, estratégias não hormonais podem ser baseadas na produção de espermatozoides (alvos testiculares), no seu armazenamento e transporte ou até mesmo estratégias que possam interferir no próprio gameta masculino (ARIFUZZAMAN; RAHMAN; PANG, 2019). Potenciais alvos, bem como estratégias farmacológicas envolvendo esses alvos não hormonais para a contracepção masculina são destacados na figura 1.

Análises aprofundadas envolvendo proteínas altamente expressas no testículo utilizando técnicas baseadas em anticorpos revelaram que essas proteínas podem estar presentes em espermatogônias, espermatócitos, espermátides redondas e espermátides alongadas, bem como em células de Sertoli (ARIFUZZAMAN; RAHMAN; PANG, 2019).

Dessa forma, diferentes tipos celulares podem ser alvos para ação farmacológica. Tendo em vista que no testículo ocorre a síntese de hormônios e a espermatogênese, eventos essenciais para o desenvolvimento das características sexuais masculinas e reprodução, esse órgão e especificamente o seu arsenal de proteínas são considerados potenciais alvos para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino não-hormonal (MATZUK; LAMB, 2008; FAGERBERG *et al.*, 2014) (Figura 1).

Outro órgão considerado um excelente alvo para contracepção masculina é o epidídimo. Esse órgão fornece um ambiente sustentável e seguro de maturação e posterior armazenamento de espermatozoides até a ejaculação. Estudos utilizando modelos experimentais de camundongos geneticamente modificados via deleção ou mutação de genes com expressão abundante ou específica no epidídimo demonstraram alterações em eventos de maturação espermática, levando à hipótese de que estes genes podem ser alvos contraceptivos (DAVIES *et al.*, 2004; ROBERTS *et al.*, 2006; MATZUK; LAMB, 2008). Por exemplo, a deleção do receptor HE6, membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G, em camundongos resultou em infertilidade relacionada à desregulação da reabsorção dos túbulos eferentes com acúmulo de líquido no testículo e consequente estase dos espermatozoides nos túbulos eferentes (DAVIES *et al.*, 2004). Outras moléculas podem interferir no trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo: agonistas colinérgicos como a metoxamina (RATNASOORIYA; GILMORE; WADSWORTH, 1980), α -bloqueadores como a prazosina (RATNASOORIYA; WADSWORTH, 1990; BHAT; SHASTRY, 2019) ou tansulosina (RATNASOORIYA; WADSWORTH, 1994).

Em adição, quando o espermatozoide se torna funcionalmente maduro, ou seja, após a sua passagem pelo epidídimo, várias proteínas transmembranares (glicoesfingolipoproteínas, galactosiltransferase, adesinas, integrinas, etc.), proteínas da matriz extracelular (vitronectina, fibronectina, laminina, etc.), enzimas (GAPDS), receptores (receptores de tirosina quinase, receptores acoplados à proteína G, canais específicos de íons, CatSpers, etc.) e transportadores (co-transportadores de cloreto de potássio, trocadores, etc.) estão envolvidos na maioria das funções espermáticas, incluindo

motilidade, hiperativação e capacidade de fertilização. Essas moléculas se tornam, portanto, opções de alvos moleculares para fármacos contraceptivos masculinos (KLENTZERIS *et al.*, 1995; REDDY; MEHERJI; SHAHANI, 1998; DARZON *et al.*, 2011; SIPILÄ; BJÖRKGREN, 2016). O foco dos pesquisadores tem sido primordialmente bloquear as funções de genes/proteínas associadas à motilidade e hiperativação do espermatozoide (JIMENEZ *et al.*, 2011; MANNOWETZ; MILLER; LISHKO, 2017), um método considerado mais acessível visto que não é necessário atravessar a barreira hemato-testicular. Vale destacar que essas drogas podem ter um curto período de latência, fator que facilitaria a adesão ao tratamento.

Perante o exposto, o conhecimento acerca da composição e fisiologia do gameta masculino é essencial para entender e focar em alvos relevantes e passíveis de intervenção farmacológica para a contracepção masculina.

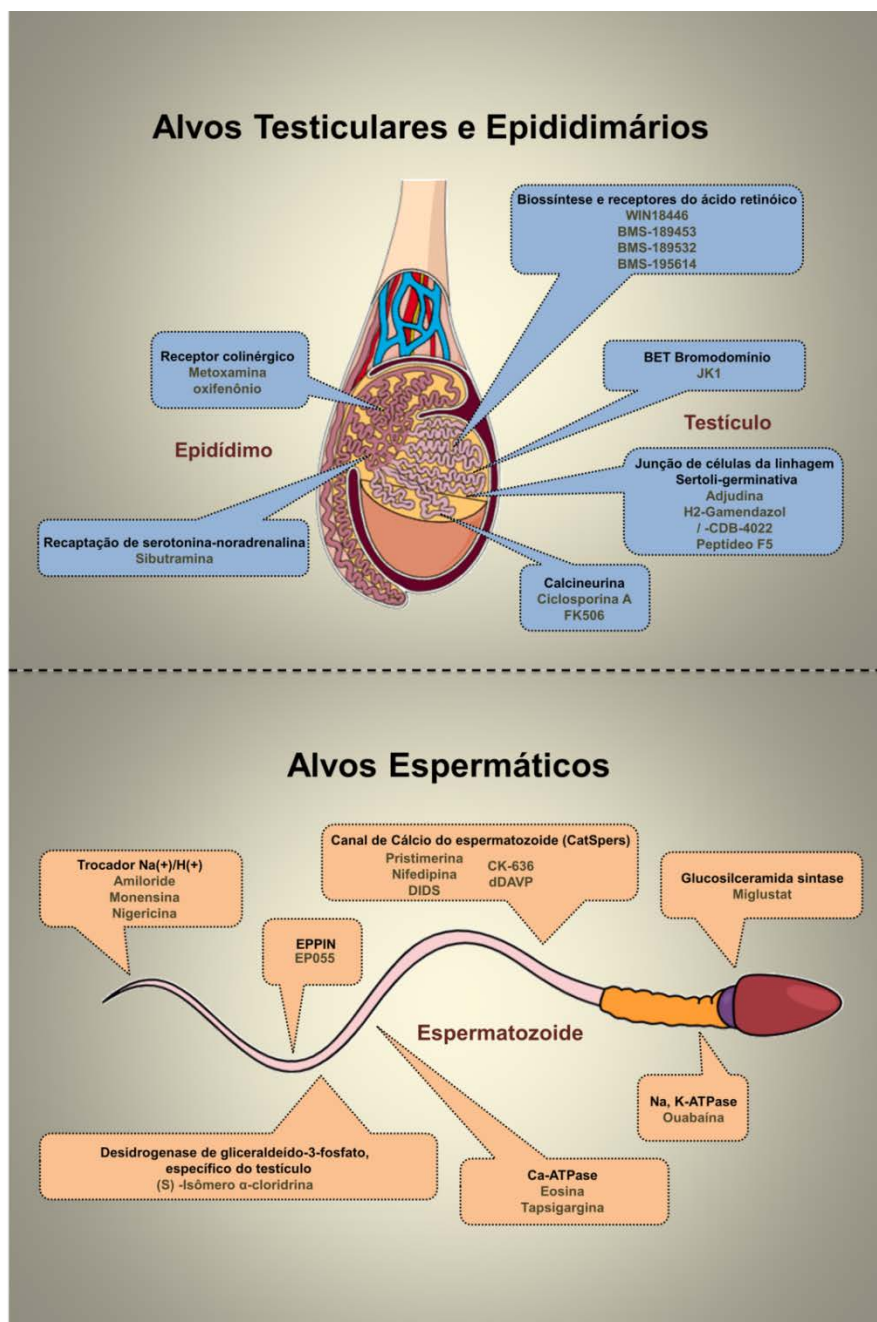


Figura 1. Resumo dos possíveis candidatos contraceptivos masculinos não hormonais em desenvolvimento (Adaptado de ARIFUZZAMAN; RAHMAN; PANG, 2019).

1.3. O espermatozoide

O espermatozoide é o produto final da espermatogênese, evento caracterizado por sucessivos processos de mitose, fases meióticas e pós-meióticas que ocorre no epitélio dos túbulos seminíferos do testículo. Durante a fase mitótica, a linhagem de células germinativas passa por uma série de divisões expandindo a população de espermatogônias

e originando espermatócitos primários. A primeira divisão meiótica começa com a última fase S do ciclo celular e origina espermatócitos secundários. A segunda fase meiótica ocorre rapidamente sem replicação de DNA para produzir espermatídes haplóides. Após a formação de espermatídes redondas ocorre o período pós-meiótico, fase caracterizada por intensa remodelação de espermatídes, formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento flagelar e eliminação de conteúdo citoplasmático, processo conhecido como espermiogênese (TOSHIMORI; EDDY, 2015). Esses eventos resultam na produção de uma célula altamente diferenciada em estrutura e função (TOSHIMORI; EDDY, 2015), que posteriormente precisa sofrer diversas modificações bioquímicas para adquirir capacidade de fertilização.

Os principais componentes do espermatozoide de mamíferos são a cabeça e o flagelo (cauda), unidos pela peça de conexão (Figura 2). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e pouco conteúdo citoplasmático. O núcleo contém cromatina altamente condensada e no domínio anterior ao núcleo é encontrado o acrossoma, uma vesícula que contém enzimas hidrolíticas e moléculas fundamentais para a fertilização. A partir da peça de conexão, o flagelo é dividido sucessivamente na peça intermediária, peça principal e peça final. O flagelo como um todo contém um complexo central de microtúbulos formando o axonema, que é cercado por fibras densas que se estendem desde a peça de conexão até o final do flagelo. A peça intermediária contém a bainha mitocondrial, uma hélice de mitocôndrias em torno das fibras densas e axonema. A peça principal contém uma bainha fibrosa cercando as fibras densas e o axonema, sendo a maior parte do comprimento do flagelo, enquanto a peça final que possui o menor comprimento do flagelo contém apenas microtúbulos axonemais cercando as fibras densas e axonema (Figura 2) (ROOSEN-RUNGE, 1977).

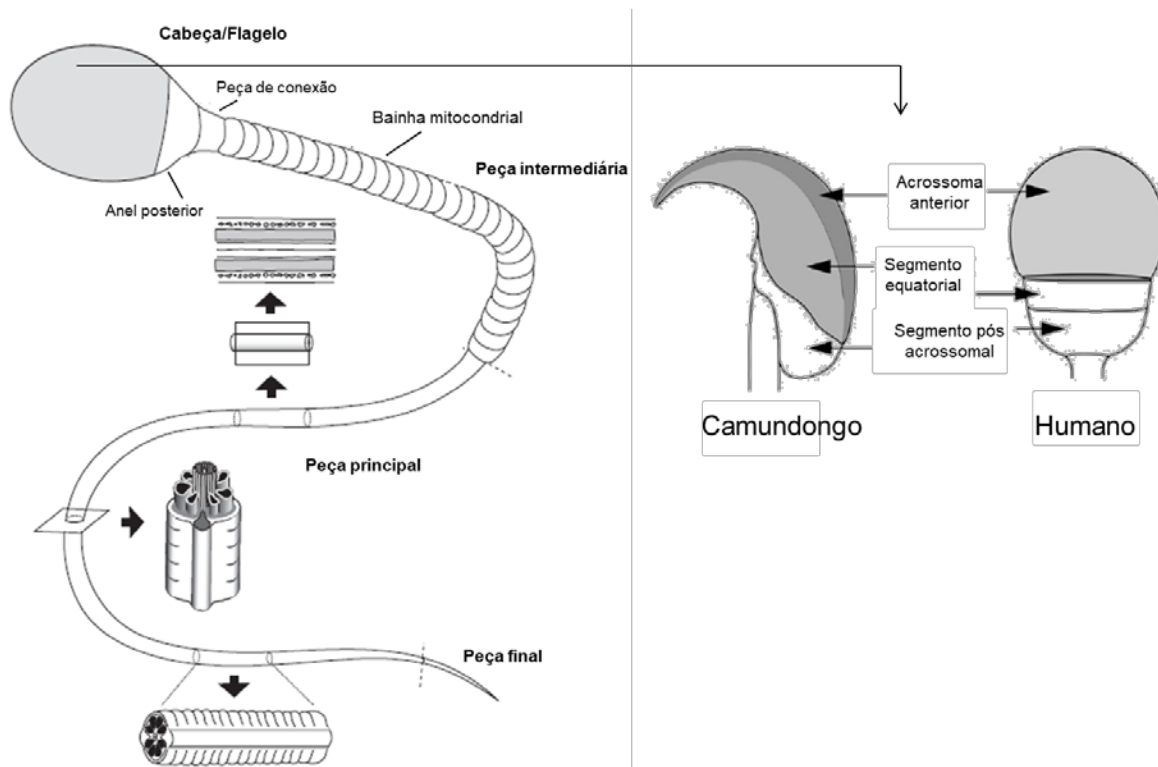


Figura 2. Características gerais do espermatozoide de mamífero. A cabeça do espermatozoide é anexada ao flagelo pela peça de conexão em uma borda denominada anel posterior. As regiões do flagelo são denominadas peça intermediária, peça principal e peça final. A peça intermediária contém a bainha mitocondrial, enquanto a peça principal contém a bainha fibrosa (Adaptado de TOSHIMORI; EDDY, 2015). Diferenças entre a morfologia da cabeça do espermatozoide murino e humano são mostradas à direita.

As características estruturais dos espermatozoides de mamíferos refletem em suas funções imprescindíveis para fertilização (CARRELL, 2012). O acrossoma contém enzimas específicas e moléculas da matriz necessárias para penetração da célula nos revestimentos do oócito e consequente alcance da fertilização. O flagelo contém fontes de energia e uma maquinaria característica para gerar a motilidade necessária para a chegada do espermatozoide até o oócito. O conjunto desses eventos é essencial para a entrega do genoma paterno ao oócito, onde os pró-núcleos masculinos e femininos vão se fundir para começar o desenvolvimento do zigoto (CARRELL, 2012). Nesse contexto, várias proteínas estão envolvidas na regulação das funções espermáticas, incluindo motilidade, hiperativação e interação com o oócito, fornecendo muitos alvos moleculares para a

próxima geração de fármacos contraceptivos (Figura 1) (BURKS *et al.*, 1995; KLENTZERIS *et al.*, 1995; DARSZON *et al.*, 2011; ARIFUZZAMAN; RAHMAN; PANG, 2019).

1.4. Proteínas espermáticas como alvos para contracepção masculina

A motivação para o desenvolvimento de fármacos que possam interferir na motilidade ou hiperativação do espermatozoide se dá principalmente pelo fato de que essas drogas não precisam atravessar a barreira hemato-testicular. Além disso, essas potenciais drogas podem ter um período curto de latência, permitindo talvez que sua administração seja antes da relação sexual (ARIFUZZAMAN; RAHMAN; PANG, 2019).

Por exemplo, a glucosilceramida sintase é uma enzima envolvida na biossíntese e metabolismo do glicoesfingolípido, componente abundante da membrana do espermatozoide, que caso ocorra alguma deficiência pode comprometer a fertilidade (YILDIZ *et al.*, 2006). A administração de miglustat (inibidor da glucosilceramida sintase) em camundongos normais resultou em infertilidade reversível com redução da motilidade espermática e desregulação na morfologia do acrossoma (VAN DER SPOEL *et al.*, 2002). Em contraste, a administração desse composto em homens saudáveis por 6 semanas não causou efeitos sobre a motilidade do espermatozoide, morfologia ou reação acrossômica (AMORY, 2016).

Outro alvo em destaque é a GADPS, proteína flagelar específica do espermatozoide que está ligada ao citoesqueleto flagelar, desempenha um papel crítico na glicólise. Foi demonstrado que camundongos machos deficientes para GADPS possuem contagem de espermatozoides severamente prejudicada e são completamente inférteis devido à motilidade espermática severamente prejudicada (MIKI *et al.*, 2004). Estudos envolvendo inibição do GADPS revelaram que a administração do isômero (S) α -cloridrina (SACH) (composto químico orgânico e contaminante comum de alimentos) em doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg em ratos durante 52 dias, induziu rápido comprometimento não apenas da motilidade, mas também da hiperativação. Este resultado foi obtido por afetar a biossíntese

de ATP e AMP cíclico após inibição do GADPS, comprometendo a capacidade de fertilização dos animais (ZHANG *et al.*, 2012).

Outra abordagem interessante para bloquear as funções dos espermatozoides é focar em proteínas transmembranares específicas de espermatozoides denominadas “Canais de Cátions dos espermatozoides”, do inglês “CatSper” (REN, 2010). Os canais CatSper controlam a entrada de cálcio no flagelo do espermatozoide induzida pela alcalinização do pH pelos NHEs (*Na⁺/H⁺ Exchanger*, do inglês), sendo fundamental para o controle da motilidade espermática e reação acrossômica (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1989; DEMARCO *et al.*, 2003). Foi demonstrado que espermatozoides humanos incubados com dois bloqueadores de CatSper (pristimerina e lupeol; ~1 µM) (MANNOWETZ; MILLER; LISHKO, 2017) apresentaram motilidade e hiperativação diminuídas. Embora o mecanismo molecular ainda não esteja completamente esclarecido, Mannowetz e colaboradores (MANNOWETZ; MILLER; LISHKO, 2017) sugeriram que os inibidores podem atuar como compostos contraceptivos, impedindo a hiperativação dos espermatozoides e evitando a fertilização.

Esse cenário demonstra a existência de diversos candidatos que possuem características essenciais para um alvo contraceptivo, ou seja, possuem papel essencial na fertilidade e são passíveis de manipulação farmacológica (KOPF, 2008). Dentre as macromoléculas que se encaixam nesse perfil, a proteína espermática EPPIN (do inglês, *Epididymal protease inhibitor*) pode ser destacada. Esse alvo é considerado promissor devido à sua atividade crucial no controle na motilidade dos gametas masculinos (O’RAND *et al.*, 2011; O’RAND; SILVA; HAMIL, 2016).

1.5. EPPIN

O gene *EPPIN* está localizado em um cluster no cromossomo 20q12-q13 humano e codifica uma proteína de secreção de 133 resíduos de aminoácidos, contendo duas sequências consenso de domínios inibidores de protease do tipo WFDC (do inglês, *Whey-acidic protein-type four disulfide core gene family*) [C-x-/C/-[DN]-x(2)-C-x(S)-C-C] e Kunitz

[Fx(3)-G-C-x(6)-[FY]-x(5)-C] (RICHARDSON *et al.*, 2001). Loci ortólogos conservados do gene EPPIN foram encontrados nos cromossomos 2 e 3 de camundongos e ratos, respectivamente (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; CLAUSS; LILJA; LUNDWALL, 2005). Tanto em humanos quanto em roedores, a EPPIN é produzida pelas células de Sertoli do testículo e células epiteliais do epidídimo, sendo secretada e posteriormente ligada à superfície do espermatozoide (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; (SILVA *et al.*, 2012a).

Na superfície dos espermatozoides epididimários, a EPPIN forma um complexo proteico por ligação à clusterina (CLU) e lactotransferrina (LTF) (WANG, Z. *et al.*, 2007). Logo após a ejaculação, os espermatozoides são banhados em um coágulo de sêmen e a proteína seminal semenogelina-1 (SEMG1), proteína mais abundante do plasma seminal humano e fator inibitório endógeno da motilidade espermática (SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013; MITRA; RICHARDSON; O'RAND, 2010), é inserida ao complexo de proteínas (WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007). A interação EPPIN-SEMG1 na superfície dos espermatozoides ejaculados resulta na inibição da motilidade espermática progressiva no coágulo de sêmen (ROBERT; GAGNON, 1995; MITRA; RICHARDSON; O'RAND, 2010; SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013). Somente após a degradação da SEMG1 pelo antígeno prostático específico (PSA) e consequente liquefação do coágulo do sêmen, os espermatozoides adquirem motilidade progressiva (ROBERT; GAGNON, 1995). Em adição, o complexo EPPIN/LTF/CLU/SEMG1 fornece proteção aos espermatozoides, uma vez que a EPPIN (YENUGU *et al.*, 2004; MCCRUDDEN *et al.*, 2008), LTF e SEMG1 (BOURGEON *et al.*, 2004) são potentes agentes microbicidas e CLU (MATSUDA *et al.*, 2003) atua inibindo a atividade das metaloproteinases. Dessa forma, esse complexo de proteínas ajuda a garantir a sobrevivência e preparação dos espermatozoides durante seu caminho para a fertilização (WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007).

O potencial da EPPIN como alvo farmacológico para contracepção masculina prosperou quando macacos adultos imunizados com a EPPIN humana recombinante, e que desenvolveram altos títulos de anticorpos contra EPPIN na circulação e no sêmen,

apresentaram inibição reversível e segura da fertilidade (O'RAND *et al.*, 2004). De maneira interessante, os anticorpos contraceptivos anti-EPPIN isolados desses macacos, e que reconhecem epítipo na região C-terminal da proteína (Figura 3), inibiram a motilidade de espermatozoides humanos *in vitro*, de forma semelhante à SEMG1 (O'RAND *et al.*, 2009; (O'RAND; WIDGREN, 2012). Ensaio de competição demonstraram que os anticorpos contraceptivos anti-EPPIN competiram com a SEMG1 pela ligação à EPPIN, confirmando que a região C-terminal da EPPIN possui sequências complementares de interação com ambos os ligantes (O'RAND *et al.*, 2009).

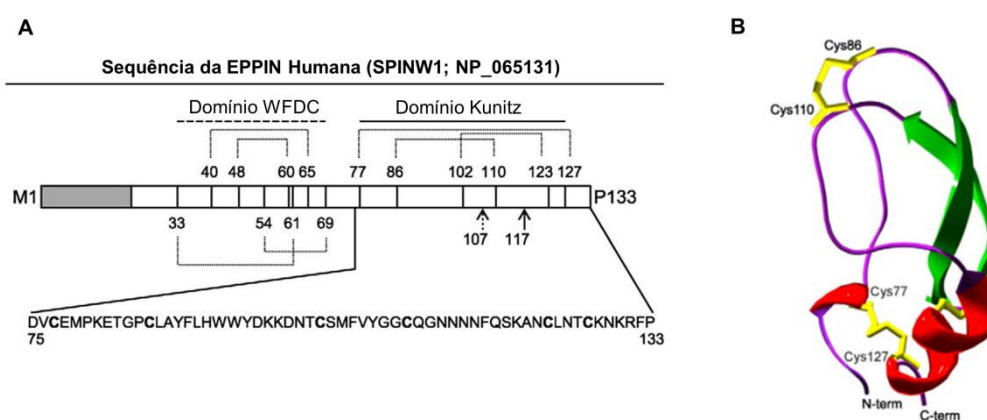


Figura 3. Representação estrutural da EPPIN humana. **A)** Representação esquemática da sequência da EPPIN humana contendo domínios WFDC (N-terminal) e Kunitz (C-terminal). Os resíduos de cisteína são indicados por linhas verticais. Os resíduos Tyr107 e Phe117 são indicados por setas pontilhadas e sólidas, respectivamente. As ligações dissulfeto são ilustradas por linhas tracejadas entre os resíduos de cisteína indicados nos domínios WFDC e Kunitz. Os resíduos D75-P133 da região C-terminal da EPPIN contendo o local de ligação para SEMG1 e LTF são mostrados. Caixa cinza indica o peptídeo sinal. **B)** Estrutura do domínio Kunitz da EPPIN apresentando alfa hélice (vermelho), cadeias beta (verde), loop (púrpura) e três ligações dissulfeto (amarelo) (SILVA *et al.*, 2012b).

A dinâmica da interação EPPIN-SEMG1 foi investigada visando o desenvolvimento de drogas que mimetizam a ação da SEMG1 e de anticorpos contra a EPPIN resultando em perda da motilidade espermática (O'RAND; SILVA; HAMIL, 2016). De fato, estudos recentes mostraram que o composto EP055, que compete com a SEMG1 e com o anticorpo anti-EPPIN S21C pela ligação a EPPIN, foi capaz de inibir a motilidade dos espermatozoides em macacos após 30 horas da administração intravenosa (O'RAND *et al.*, 2018), com reversibilidade total da motilidade espermática 18 dias após a infusão. A hipótese é que o

composto EP055 causa rápida diminuição no pH e níveis intracelulares de cálcio do espermatozoide, afetando a motilidade espermática (O'RAND *et al.*, 2018).

Todos esses dados demonstram que a EPPIN é uma proteína de superfície do espermatozoide crucial para o controle da motilidade espermática, podendo ser explorada como alvo para o desenho racional de fármacos contraceptivos com ação “espermotática”, ou seja, capazes de inibir a locomoção dos espermatozoides. Dessa forma, considerando o desenvolvimento de novos fármacos de ligação à EPPIN, são necessários modelos animais para testar a sua segurança e eficácia *in vivo* em ensaios pré-clínicos, bem como para proporcionar uma compreensão mais profunda das funções e mecanismos de ações da EPPIN. Para tanto, o camundongo surge como um modelo experimental interessante, sabendo que a sequência primária da EPPIN humana é altamente conservada em relação à EPPIN murina, atingindo cerca de 80% de identidade em sua região C-terminal.

Embora a expressão da EPPIN tenha sido demonstrada no testículo e no epidídimo de camundongo (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003), o conhecimento sobre seu perfil de expressão em tecidos reprodutivos e não reprodutivos ainda é limitado. Além disso, os seus potenciais parceiros de interação no espermatozoide murino maduro ainda carecem de identificação, considerando que o racional para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de interferir na função espermática pode ser baseado no conhecimento acerca das interações entre a EPPIN e outras proteínas. Assim, nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da regulação da expressão, função e mecanismo de ação da EPPIN.

Nesse contexto, construímos a hipótese de que a EPPIN presente na superfície do espermatozoide de camundongos possui conservação funcional com relação à EPPIN humana e interage com proteínas secretadas pela vesícula seminal, desempenhando papéis essenciais na função espermática. Assim, neste estudo investigamos pormenorizadamente o perfil de expressão da EPPIN em tecidos reprodutivos e não reprodutivos de camundongos e identificamos suas potenciais proteínas de interação no espermatozoide maduro.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o perfil de interação proteína-proteína da EPPIN do espermatozoide de camundongos, para entender o seu papel fisiológico na fertilidade masculina e facilitar o desenvolvimento de modelos experimentais pré-clínicos para avaliação de potenciais fármacos contraceptivos masculinos ligantes dessas proteínas.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em tecidos de camundongos adultos;
- Caracterizar o perfil de expressão e localização da EPPIN em espermatozoides de camundongos adultos;
- Verificar o impacto da maturação sexual na expressão do gene *Eppin* em tecidos de camundongos;
- Identificar as potenciais proteínas de interação da EPPIN nos espermatozoides de camundongos;
- Investigar o perfil de interação entre a EPPIN e suas proteínas parceiras.

Materiais e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Estratégias Experimentais

De forma sucinta, adotamos os seguintes experimentos para o desenvolvimento do presente trabalho:

- (i) Ensaio de PCR convencional em órgãos reprodutivos e não reprodutivos com o objetivo de caracterizar o perfil de expressão da *Eppin* em tecidos de camundongos machos adultos (90 dias);
- (ii) Ensaio de *Western blot* nos tecidos que demonstraram expressão positiva para o transcrito com o intuito de verificar se a expressão também é positiva ao nível proteico;
- (iii) Ensaio de imuno-histoquímica e imunofluorescência para caracterizar a distribuição celular da EPPIN em tecidos e espermatozoides de camundongos adultos (90 dias);
- (iv) Ensaio de PCR em tempo real e imuno-histoquímica em amostras de testículo, epidídimo (segmentado ou inteiro) e glândula seminal de camundongos em diferentes períodos do desenvolvimento (10, 20, 40, 60 e 90 dias) para verificar o impacto da maturação sexual na expressão do transcrito e distribuição celular da EPPIN;
- (v) Ensaio de co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN Q20E seguido por espectrometria de massas com o foco em identificar as potenciais proteínas de ligação da EPPIN no espermatozoide de camundongos adultos (90 dias) incubado com fluido da glândula seminal;
- (vi) Ensaio de *Western blot* para confirmação dos resultados obtidos no ensaio de espectrometria de massas;
- (vii) Ensaio de *Far Western blot* para confirmação da interação entre EPPIN e SVS2.

Para representar de forma mais clara as análises realizadas, um esquema da estratégia experimental é apresentado na Figura 4:

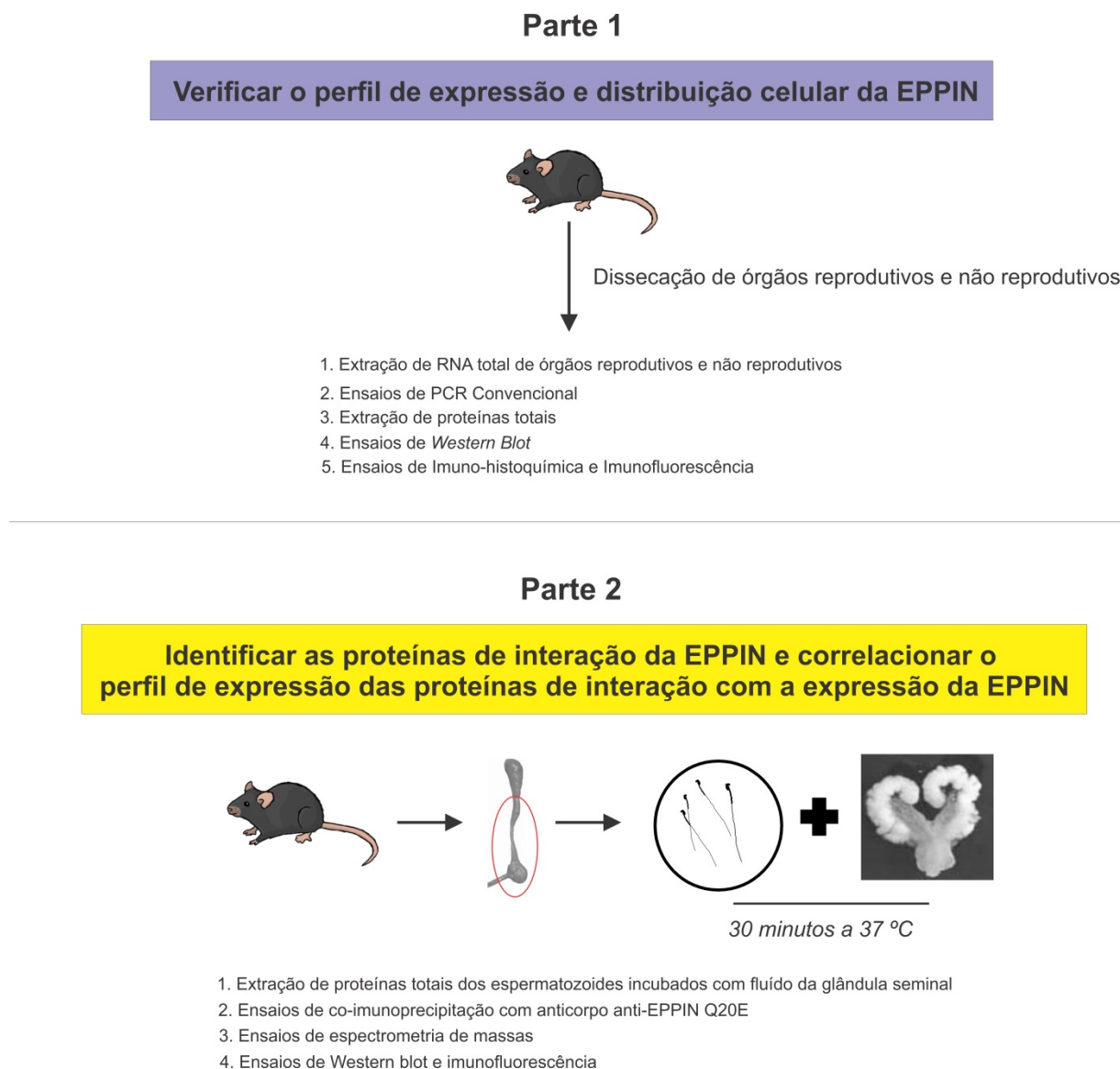


Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental do projeto.

3.2. Anticorpos

Os anticorpos utilizados nos experimentos de *Western blot*, imuno-histoquímica, imunofluorescência e co-immunoprecipitação estão descritos detalhadamente na tabela 1 (anticorpos primários) e tabela 2 (anticorpos secundários). Vale destacar que alguns anticorpos foram sintetizados por empresas especializadas após verificação da especificidade na literatura e outros já estavam disponíveis comercialmente.

Tabela 1. Informações sobre os anticorpos primários utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica, imunofluorescência e *Western blot*

Anticorpo	Animal	Epítipo alvo	Referência ou Empresa
Anti-EPPIN Q20E	Coelho	²⁰ QGPSLADLLFPRRCPRFREE ³⁹	Sivashanmugam et al 2003; Wang et al, 2007
Anti-EPPIN S21C	Coelho	¹⁰³ SMFVYGGCQGNNNNFQSKANC ¹²³	O'Rand et al, 2009
Anti-SVS2	Coelho	³⁵³ RKNFNPGNYFTKGGADC ³⁶⁷	Kawano et al, 2014
Anti-SVS3	Coelho	⁷⁵ DADADMGGALSSQE ⁸⁸	Araki et al, 2016
Anti-actina	Cabra	-	Santa Cruz Biotechnology, cat. #1616

Tabela 2. Informações sobre os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica, imunofluorescência e *Western blot*

Anticorpo	Animal	Empresa	Catálogo
Anti-Rabbit IgG Antibody	Cabra	Abcam	ab64256
Alexa fluor 594 – conjugated anti-rabbit	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-585-152
Peroxidase-conjugated AffinePure Anti-Rabbit	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-035-152
Peroxidase-conjugated AffinePure Anti-Goat	Boi	Jackson ImmunoResearch	805-035-180

3.3. Animais e coleta dos órgãos

Utilizamos camundongos C57BL/6 machos imaturos e maduros (10, 20, 40, 60 e 90 dias de idade) provenientes do biotério do Instituto Nacional de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a fase inicial do projeto. Em adição, parte dos animais adultos (90 dias) foi obtida posteriormente da “Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio” (Paulínia/SP).

Mantivemos os animais no Departamento de Farmacologia do IBB/UNESP sob luz controlada (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (22 a 24°C), com livre acesso à água e

ração padrão para roedores. Realizamos todos os procedimentos de acordo com as diretrizes para cuidados com animais e uso de animais de laboratório, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP (processos nº 1049 e nº 703) e UNIFESP (nº 9776170216) (Ver anexos I a III).

Os animais foram eutanasiados por overdose de isoflurano por via inalatória, seguido de deslocamento cervical para confirmação da morte do animal. Em seguida, os órgãos reprodutivos e não reprodutivos dos animais foram dissecados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até processamento ou imersos em solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,4) para processamento histológico em paraplast. Também coletamos espermatozoides das diferentes regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) para extração de proteínas totais e ensaios de imunofluorescência conforme detalhado nos itens 3.8 e 3.9.

3.4. Extração do RNA total

Extraímos o RNA total dos órgãos listados acima com reagente de TRIzol[®] (Life Technologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, homogeneizamos as amostras em reagente de TRIzol[®] com auxílio de um homogeneizador Polytron (PT 1300 D, Kinematica). Após centrifugação (10000 x g, 10 min), adicionamos clorofórmio e homogeneizamos as amostras em vórtex. Após 10 min de incubação e nova centrifugação (10000 x g, 15 min), coletamos a fase aquosa superior contendo RNA total, que foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75% (v/v). O RNA total foi ressuspenso em 10-50 µl de água livre de nucleases tratada com DEPC. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro para determinar a concentração de RNA e seu grau de pureza através da relação A260/A280. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, SYBR[™] Safe (Invitrogen, cat. #S33102), tampão TBE 1x e corrida de 1h a 100V (0,6-0,7Amp), utilizando 1 µg de RNA. Dessa forma, determinamos a integridade do RNA por observação das bandas correspondentes a 28S e

18S (rRNA). Amostras que não apresentaram bandas 18S e 28S íntegras e bem definidas, e relação A260/A280 < 1,7 foram descartadas.

Para as amostras de glândula seminal, utilizamos o kit de extração de RNA total QIAzol (Qiagen, cat. #79306), seguindo as instruções do fabricante. Este método é semelhante ao método TRIzol, com a diferença que, ao separarmos a fase aquosa contendo RNA, este é ligado em uma coluna de sílica. A coluna é lavada com tampões de lavagem, e em seguida com a eluição do RNA total em água livre de nucleases. As amostras extraídas por esse kit foram analisadas conforme descrito anteriormente.

3.5. *Reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia convencional (PCR)*

A síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total (2,5 µg) foi realizada com o kit Thermoscript™ RT-PCR System (Invitrogen, cat. #11146-016), seguindo as instruções do fabricante. Reações na ausência de transcriptase reversa foram realizadas como controle negativo para avaliar possível contaminação genômica das amostras analisadas. Para os ensaios de PCR, usamos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos transcritos *Eppin* e dos controles endógenos ciclofilina A (*Ppia*) e proteína ribossomal S18 (*Rps18*), descritos na tabela 3. Os ensaios de PCR foram realizados pela adição de alíquotas de cDNA (250 ng) a tampão de PCR contendo MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), oligonucleotídeo iniciador senso e anti-senso dos genes alvos (0,4 µM cada) e Taq DNA polimerase (1 U) em volume final de 20 µl. As condições do PCR foram: 95°C/1min, seguido de 95°C/1min – 60°C/1min – 72°C/1min por 30 (*Eppin*) ou 25 (*Rps18*) ciclos, e 72°C/3min. Os produtos de DNA resultantes foram misturados com tampão de carregamento (glicerol 60%, Tris-HCl pH 7,6 10 mM, EDTA 60 Mm, azul de bromofenol 0,03% e xileno cianol FF 0,03%) e aplicados em gel de agarose (1,5%) preparado em tampão TBE. Após eletroforese, os resultados foram documentados em fotodocumentador GBOX® Chemi XRQ (Syngene). Os produtos de DNA esperados foram então purificados do gel utilizando o kit *EasyPure Gel QuickExtraction kit* (TransBionovo, cat. #EG101-01) e, posteriormente,

sequenciados por empresa terceirizada (BPI, Botucatu-SP) para confirmação da sua identidade.

Tabela 3. Informações sobre os oligonucleotídeos iniciadores usados nos ensaios de RT-PCR e qPCR

Transcrito	N° de acesso no NCBI	Primer	Sentido	Sequência (5'-3')	Eficiência da amplificação	Amplicon (pb)
<i>Eppin</i>	NM_029325	<i>Ep_F</i>	+	tctgtgctattggcctgct	104%	204
		<i>Ep_R</i>	-	tccagcgtatcctctgttc		
<i>Rps18</i>	NM_011296	<i>S18_F</i>	+	gttcgccagaatgaagctttc	104%	207
		<i>S18_R</i>	-	tactgtcgtgggttctgcat		
<i>Ppia</i>	NM_008907	<i>Ppia_F</i>	+	gtctccttcgagctgtttgc	107%	150
		<i>Ppia_R</i>	-	gcgtgtaaagtcaccacct		

3.6. Ensaios de PCR em tempo real (qPCR)

Para a realização dos experimentos de qPCR, primeiramente testamos as concentrações de 100, 200 e 300 nM de oligonucleotídeos iniciadores utilizando amostra de segmento inicial do epidídimo de camundongo adulto (5,0 ng/reação) como controle positivo. Verificamos que as curvas de amplificação foram muito semelhantes entre as condições testadas e também confirmamos amplificação de produto único, conforme curvas de dissociação apresentadas e banda única em gel de agarose (Anexo IV). Considerando esses resultados, optamos pela utilização da concentração de 100 nM desses oligonucleotídeos iniciadores para a realização dos experimentos subsequentes.

Os experimentos de qPCR foram realizados em duplicada ou triplicata, com controles negativos consistindo de ausência de cDNA, utilizando o termociclador QuantStudio 3™ (AppliedBiosystems), kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems, cat. #A25741), para os ensaios de quantificação absoluta, ou Kappa Master Mix SYBR Universal (KappaBiosystems, cat. #KK4612), para os ensaios de expressão relativa. As sequências e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesses ensaios estão descritas na tabela 3.

Os ensaios de qPCR foram realizados para avaliar os níveis relativos do transcrito *Eppin* no testículo e epidídimo de camundongos em diferentes fases da maturação sexual (10, 20, 40, 60 e 90 dias de idade), utilizando a expressão do transcrito do gene *Ppia* ou *Rps18* como controle endógeno. Os cDNAs (5 ng/reação) foram amplificados em reação contendo 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (concentração escolhida após os ensaios de padronização citados anteriormente), nas seguintes condições: 40 ciclos de denaturação a 95°C (15 s) e anelamento a 60°C (1 min). A análise da curva de dissociação foi realizada ao final de cada reação para controle de qualidade. O cyclethreshold (Ct) e a eficiência de cada reação foram determinados de acordo com algoritmos do sistema utilizado. A expressão relativa de cada transcrito foi determinada conforme metodologia descrita por (PFAFFL, 2001).

A quantificação absoluta do transcrito *Eppin* nas diferentes regiões do epidídimo foi realizada a partir de curva de titulação do produto de PCR, obtido a partir de ensaios de PCR convencional, conforme descrito por RIBEIRO *et al.*, 2015. A curva de titulação foi construída com diluições seriadas do produto variando entre $2,0 \times 10^9$ a 20 cópias, determinadas a partir da sua concentração molar e constante de Avogrado, em função dos valores de Ct. Em paralelo, amostras de cDNA do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda; 5 ng) de camundongos adultos foram submetidas ao ensaio de qPCR em tempo real. Os respectivos valores de Ct das amostras foram comparados à curva de regressão linear da curva de titulação para obtenção do valor aproximado do número de cópias do transcrito *Eppin* para cada segmento do epidídimo.

3.7. Ensaios de imuno-histoquímica

Para os ensaios de imuno-histoquímica fixamos o testículo, epidídimo, glândula seminal (camundongos com 40, 60 e 90 dias) e glândula adrenal (camundongos com 90 dias) em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (Na_2HPO_4 anidro 10 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,4 mM, NaCl 150 mM) pH 7,4 por 24 h. Cortamos os testículos após algumas horas de imersão, para romper a túnica e auxiliar na penetração do fixador. Em seguida, lavamos os

órgãos em água corrente e os mantivemos em álcool 70% a 4°C até as próximas etapas do processamento histológico. Após o processamento para inclusão em paraplast (McCormick, cat. #39502004), seccionamos os blocos (4 µm) em micrótomo e utilizamos as secções nos ensaios de imuno-histoquímica.

Realizamos os ensaios de imuno-histoquímica conforme descrito por SILVA *et al.*, 2012a, com algumas modificações. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas ao protocolo de recuperação antigênica por incubação com tampão citrato (citrato de sódio 10 mM, Tween-20 0,05% v/v) pH 6,0 por 15 min sob fervura em micro-ondas. Após lavagem em tampão fosfato pH 7,4, incubamos as lâminas em solução de H₂O₂ 30%:Metanol (1:2, v/v) por 30 min a temperatura ambiente, sob proteção da luz, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, incubamos as lâminas em tampão fosfato por 5 min e solução de bloqueio (BSA 3%, m/v em tampão fosfato) por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagem em tampão fosfato, incubamos as lâminas com o anticorpo primário anti-EPPIN Q20E (4,6 µg/ml) diluído em solução de bloqueio a 4°C em câmara escura e úmida durante a noite.

Ao final da incubação lavamos as lâminas e sequencialmente incubamos com solução de bloqueio por 15 min e com anticorpo secundário específico (4 µg/ml) por 30 min a temperatura ambiente. Utilizamos o sistema Vectastain Standard ABC (Vector, cat. #K-6105) para evidenciar o imunocomplexo formado pelo anticorpo secundário anti-coelho ligado ao anticorpo primário, de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, lavamos as lâminas e revelamos com solução de diamino-benzidina (DAB, Vector, cat. #SK-4100) por 10 min a temperatura ambiente. Contracoramos as lâminas com hematoxilina por ~2 min, desidratamos e montamos em Permount (Fisher Sci., cat. #S70104). Realizamos o controle negativo com anticorpo primário anti-EPPIN Q20E pré adsorvido com excesso molar de 10X da EPPIN recombinante. Analisamos os resultados em microscópio Olympus Cover-018, capturamos as imagens por câmara digital (CellSens) e editamos as imagens capturadas com programa de documentação e edição de imagens Photoshop v. 12 (Adobe Systems Inc.) ou ImageJ (RUEDEN *et al.*, 2017).

3.8. Ensaio de Imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência utilizamos o protocolo descrito por SILVA *et al.*, 2012a. Coletamos espermatozoides do testículo e das diferentes regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) de camundongos a partir da incubação dos tecidos em tampão fosfato pH 7,4 seguida da realização de cortes com tesouras para permitir a saída dos espermatozoides para o meio. Após 10 min de incubação, removemos os tecidos do meio, lavamos as células com tampão fosfato por 2 vezes, e realizamos a contagem espermática em câmara de Neubauer. Diluímos a suspensão de espermatozoides para $5,0 \times 10^6$ células/ml e confeccionamos esfregaços em lâminas. Após secagem em temperatura ambiente, fixamos os esfregaços com 4% de paraformaldeído em água deionizada por 20 min e incubamos por 25 min com solução de bloqueio contendo 3% de albumina de soro bovina em tampão fosfato (NaCl 130 mM, KCl 2 mM, Na_2HPO_4 1,4 mM) suplementado com saponina (0,02% m/v).

Após essa etapa, incubamos as lâminas com o anticorpo primário anti-EPPIN Q20E (5 $\mu\text{g/ml}$) diluído em solução de bloqueio a 4°C em câmara escura e úmida durante a noite (16-18 horas). No dia seguinte, lavamos as lâminas com tampão fosfato e incubamos com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa flúor 594 por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida incubamos as lâminas com solução de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen, cat. #D1306) para marcação dos núcleos celulares. Após lavagem com tampão fosfato sob proteção da luz, montamos as lâminas com Prolong Gold (Molecular Probes, cat. #P36930) seguindo de selagem com esmalte. Ensaio de controle negativo foram realizados na ausência de anticorpo primário. As imagens foram visualizadas com microscópios Nikon E800 ou Leica CTR 4000 usando filtros de excitação apropriados. As imagens obtidas foram editadas em software ImageJ para ajuste de brilho e contraste. Para os esfregaços obtidos a partir da suspensão de células testiculares, identificamos as espermátides alongadas maduras (estágios 15-16) com base nas suas características morfológicas (formato do núcleo e da cabeça, comprimento do flagelo) (BREHM; STEGER, 2005).

3.9. Ensaio Western blot

Realizamos os ensaios de *Western blot* em amostras de espermatozoides isolados do epidídimo (cabeça contendo segmento inicial, corpo e cauda) bem como em órgãos que apresentaram expressão positiva do transcrito EPPIN. Realizamos os experimentos de acordo com a metodologia descrita por SILVA *et al.*, 2010. Espermatozoides de diferentes regiões do epidídimo (segmento inicial/cabeça, corpo e cauda) foram isolados em tampão fosfato pH 7,4, além do testículo, epidídimo, ducto deferente, glândula seminal e glândula adrenal que foram dissecados. Em seguida tanto os espermatozoides isolados como os tecidos foram ressuspensos em tampão de lise RIPA (NP-40 1% v/v, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% m/v) contendo coquetel inibidor de protease (Sigma, cat. #P8340). Determinamos a concentração de proteínas totais utilizando o método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, cat. #500-0006) para amostras de tecidos, e MicroBCA (Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, cat. #23235) para amostras de espermatozoides, usando albumina de soro bovina (BSA) como padrão. Separamos os extratos proteicos totais (50 e 20 µg para tecidos e espermatozoides, respectivamente) em eletroforese por gel de acrilamida 4-12% em sistema NuPage Bis-Tris (Invitrogen, cat. #NP0321BOX) a 200 V por 25 min, utilizando tampão de corrida (Thermo Fisher Scientific, cat. #NP0002). Em seguida, transferimos as proteínas do gel para membrana de PVDF (BioRad, cat. #88520) em sistema de transferência semi-seco *Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, cat. #170-3940) a 15 V por 1 h, utilizando tampão de transferência (Thermo Fisher Scientific, cat. #NP0006). Verificamos a conformidade da transferência por coloração da membrana com solução de amido black 0,1% por 2 min.

Após ativação com metanol, incubamos as membranas em solução de bloqueio [tampão TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, v/v), contendo 5% de leite desnatado (m/v)] por 1,5 h. Em seguida, lavamos as membranas com tampão TBS-T e incubamos com anticorpo anti-EPPIN Q20E (0,4 µg/ml e 1,5 µg/ml para amostras de tecido e espermatozoide, respectivamente), anticorpo anti-EPPIN S21C (0,4 µg/ml e 1,5 µg/ml para amostras de tecido e espermatozoide, respectivamente), anticorpo anti-SVS2

(0,2 µg/ml), anticorpo anti-SVS3 (0,2 µg/ml) e anticorpo anti-actina (0,03 µg/ml) como controle positivo das amostras, bem como, anticorpos secundários apropriados conjugados com enzima peroxidase (0,01/ml). Submetemos então as membranas para revelação das bandas imunorreativas com reagente Luminol Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, cat. #34095), utilizando sistema fotodocumentador G-BOX (SYNGENE). Ensaios de controle negativo para o anticorpo anti-EPPIN foram realizados na presença de anticorpo primário pré-adsorvido com 10 vezes de excesso molar da EPPIN de rato recombinante ou utilizando IgG de coelho (Vector Laboratories, cat. #I1000) em substituição ao anticorpo anti-EPPIN. Para o controle dos anticorpos primários anti-SVS2 e anti-SVS3 utilizamos os próprios anticorpos bloqueados com 30 vezes de excesso molar do peptídeo referente ou ausência de anticorpo primário.

3.10. Ensaios de co-imunoprecipitação

Para os ensaios de co-imunoprecipitação, utilizamos o kit MS Compatible Magnetic IP, protein A/G, (Pierce, cat. #90409), de acordo com as recomendações do fabricante. Coletamos aproximadamente $14,0 \times 10^6$ espermatozoides do corpo/cauda do epidídimo, sendo necessário dois a três camundongos adultos para coletar esse número de espermatozoides, em tampão fosfato (fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2; Thermo Fisher Scientific, cat. #28372). Também coletamos a fração do fluido da glândula seminal solúvel em tampão fosfato. Para isso, transferimos o fluido total para tubo de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 1 ml de tampão fosfato por glândula. Após centrifugação rápida (10.000 x g, 30 s), coletamos a fração solúvel e descartamos o precipitado.

Incubamos os espermatozoides com a fração solúvel do fluido da glândula seminal por 30 min, a 37°C (5% CO₂/95% ar) em volume final de ~3 ml. Após lavagem das células com tampão fosfato em duas etapas de centrifugação (800 x g, 4°C, 10 min), adicionamos o tampão de lise (500 µl/50 mg de pellet de células) contendo coquetel de inibidores de protease (Sigma, cat. #P8340) e processamos as amostras por: 1) agitação em vórtex por 30 s; 2) um ciclo de sonicação a 30 Hz/1 min em gelo; 3) homogeneização em

homogeneizador Polytron (PT 1300 D, Kinematica), 17000 x g, 1 min em gelo; 4) incubação a 4°C por 1 hora sob agitação e; 5) três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em gelo. Centrifugamos as amostras (13.000 x g, 10 min) e realizamos a quantificação de proteínas totais no extrato pelo método “Micro BCA” (Pierce, cat. #23235), utilizando BSA como padrão.

Na etapa seguinte, adicionamos 5 µg de anticorpo anti-EPPIN Q20E ao lisado (400-1000 µg de proteínas totais). Após incubação durante a noite (16-18 h) a 4°C sob agitação, adicionamos ao lisado as nanoesferas magnéticas acopladas a proteína A/G (25 µl) e incubamos por 1 h a temperatura ambiente para formação do imunocomplexo nanoesferas/anticorpo/EPPIN/proteínas parceiras. Em seguida, lavamos o imunocomplexo com tampão de lavagem A e B, utilizando suporte magnético DynaMag-2 Magnet (Thermo Scientific, cat. #12321D), por 3 vezes cada. Por fim, eluímos as proteínas co-precipitadas em tampão de eluição utilizando o mesmo suporte magnético, e secamos os eluatos em concentrador à vácuo (Labconco, CentriVap Concentrador). Ensaios de controle negativos foram realizados substituindo o anticorpo por 5 µg de IgG de coelho (Vector Laboratories, cat. #I-1000). As amostras secas foram armazenadas a -80°C até a etapa seguinte. Esquema representativo do ensaio de co-precipitação é demonstrado na figura 5.

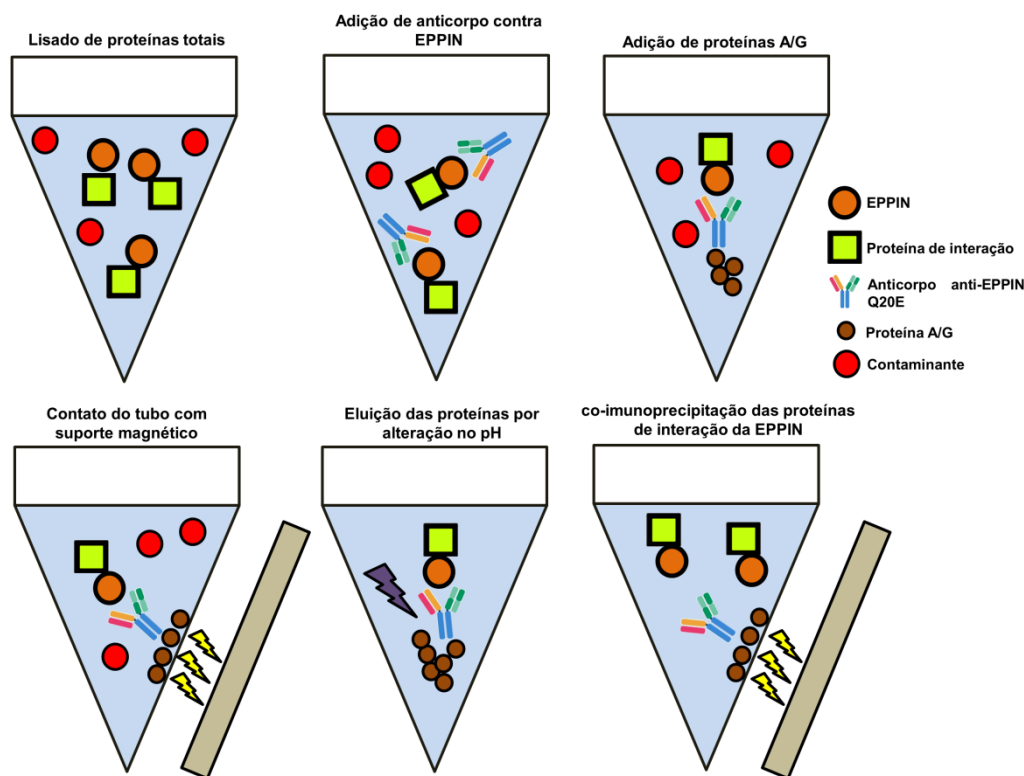


Figura 5. Representação esquemática do ensaio de co-imunoprecipitação utilizado neste estudo.

3.11. Digestão enzimática das proteínas em solução

Resumidamente, adicionamos ureia 6M (Life Science, cat. #0568) e tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) 10 mM (Sigma Aldrich, Cat. #646547) ao precipitado e incubamos as amostras a 37°C por 30 min, para a desnaturação e redução das ligações dissulfeto. Em seguida, adicionamos iodoacetamida 0,5 M e incubamos por mais 30 min a temperatura ambiente, para alquilação dos resíduos de metionina. Após a etapa de alquilação, adicionamos bicarbonato de trietilamônio 50 mM (Sigma Aldrich, cat. #T7408), para diminuir a concentração de ureia (<1M), 100 ng de enzima tripsina (Promega, cat. #V5111) e incubamos durante a noite a 37°C, para digestão enzimática das proteínas. Interrompemos a reação pela adição de 10 µl de ácido fórmico 5% (v/v). Após centrifugação (15.000 × g, 2 min), para sedimentar qualquer material insolúvel, submetemos os digestos trípticos às colunas de dessalinização PeptideCleanup C18 Spin (Agilent Technologies, cat #5188-2750), segundo as recomendações do fabricante.

3.12. Sequenciamento peptídico espectrometria de massas

As análises *label free* de espectrometria de massas foram realizadas em equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex) acoplado ao espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). A ionização foi obtida utilizando fonte *Nanospray ion source* (Picochip). O modo de operação utilizado foi ionização positiva pelo método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10 s. Os dados de espectrometria foram então adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19).

3.13. Análise dos dados de espectrometria de massas

Os dados brutos no formato RAW foram submetidos ao software PatternLab, versão 4.0.0.84 (CARVALHO *et al.*, 2016), para identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados foram: banco de dados NCBI (taxonomia *Mus musculus*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional: carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável: oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*False Discovery*) máxima foi considerada de 1%.

As interações proteicas também foram investigadas usando o software STRING (versão 10.5, <http://string-db.org>) (SZKLARCZYK *et al.*, 2017) com os parâmetros básicos: Score > 0,40, e valor de p < 1.0e-16.

3.14. Ensaios Far Western blot

Primeiramente, realizamos etapas de transformação da *Eppin* murina inserida no vetor pET-28a(+)-TEV (sequência da *Eppin* codifica os resíduos de aminoácidos P22-T134 da *Eppin* murina: NM_029325 e NP_083601) em *E. coli* One Shot BL21 (DE3) pLysS quimicamente competente (GenScript, cat. #44037) em meio de cultura LB suplementado

com glicose 5% e canamicina (50 µg/mL), de acordo com as instruções do fabricante. A indução da expressão da proteína foi realizada com adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio de cultura em concentração final de 1 mM e a purificação foi realizada a partir dos *pellets* de bactérias congelados, por cromatografia de afinidade em condições denaturantes, conforme metodologia descrita por SILVA *et al.*, 2012b. Utilizamos também a proteína recombinante SVS2 (do inglês, “Seminal vesicle secretory protein 2”) (GenScript, cat. #U3857DK220-5), além da EPPIN humana e SEMG1 disponíveis no laboratório (SILVA *et al.*, 2012b)

Realizamos os experimentos de acordo com metodologias descritas por WANG *et al.*, 2005 e WU; LI; CHEN, 2007 com algumas modificações. Separamos as proteínas recombinantes EPPIN murina (1 µg) ou SVS2 (1 µg) por eletroforese em gel de acrilamida 4-12% em sistema NuPage Bis-Tris (Invitrogen, cat. #NP0321BOX) conforme descrito anteriormente (ver item 3.9). Após ativação com metanol, incubamos as membranas em solução de bloqueio [tampão TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, v/v), contendo 1% de BSA (m/v)] por 1 h. Em seguida, lavamos as membranas com tampão TBS-T e incubamos com as proteínas recombinantes EPPIN murina (3 µg/ml) ou SVS2 (3-5 µg/ml) em solução de bloqueio [tampão TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,01%, v/v), contendo 0,5% de BSA (m/v)] durante a noite (16-18 h) a 4°C sob agitação. No dia seguinte incubamos as membranas em solução de bloqueio [tampão TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, v/v), contendo 5% de leite desnatado (m/v)] por 1,5 h. Em seguida, lavamos as membranas com tampão TBS-T e incubamos com anticorpo anti-EPPIN Q20E (1,3 µg/ml) ou anticorpo anti-SVS2 (0,15 µg/ml).

Submetemos então as membranas para revelação das bandas imunorreativas com reagente Luminol Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, cat. #34095), utilizando sistema fotodocumentador G-BOX (Syngene). Realizamos no mínimo dois experimentos independentes para cada condição (EPPIN no gel e SVS2 em solução ou SVS2 no gel e EPPIN em solução). Ensaios de controle positivo foram realizados com

amostras de SEMG1 (2 µg) incubadas com EPPIN humana recombinante (1 µg) e posteriormente com anticorpo anti-EPPIN Q20E. Ensaios de controle negativo para os anticorpos primários foram realizados sem incubação das membranas com proteína recombinante ou em amostras de BSA (0,5 µg) em substituição à proteína recombinante no gel.

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Utilizamos o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados e o teste F (dois grupos) ou de Bartlett (três ou mais grupos) para verificar a homocedasticidade dos dados. As análises entre dois grupos foram realizadas utilizando teste *t* de Student, enquanto as diferenças entre mais de dois grupos, por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo programa *GraphPad Prism 5.01* (GraphPad Software).

Resultados

***Capítulo 1: Perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em
tecidos e no espermatozoide de camundongos***

4. Resultados

4.1 - Capítulo 1: Perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em tecidos e no espermatozoide de camundongos

4.1.1. A EPPIN é diferencialmente expressa em tecidos reprodutivos de camundongos machos adultos

A análise por RT-PCR revelou produtos amplificados do transcrito *Eppin* (204 pb) no testículo, epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), ducto deferente e glândula seminal (Figura 6A). Não observamos RNAm da *Eppin* na próstata e nos órgãos não reprodutivos, com exceção da glândula adrenal (Figura 6A). Confirmamos a identidade do transcrito *Eppin* no segmento inicial, glândula seminal e glândula adrenal por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Consistente com os dados de RNAm, a análise de *Western blot* revelou a expressão da EPPIN no testículo, epidídimo, ducto deferente, glândula seminal e glândula adrenal (Figura 6B). Observamos a presença de duas bandas imunorreativas com massas moleculares aparentes de ~14 e ~21 kDa no testículo. Nas diferentes regiões do epidídimo, ducto deferente e glândula seminal, detectamos uma banda imunorreativa de ~14 kDa, e somente no ducto deferente observamos uma segunda banda imunorreativa de ~36 kDa (Figura 6B). Na glândula adrenal, detectamos duas bandas imunorreativas de ~14 e ~70 kDa (Figura 6B), confirmando o local de expressão da EPPIN fora do sistema genital masculino de camundongos adultos. A especificidade do anticorpo anti-EPPIN Q20E foi demonstrada pela presença de bandas imunorreativas (~15, ~19 e ~36 kDa) para o alvo ao utilizar amostras de EPPIN recombinante humana e murina (controles positivos). Além disso, evidenciamos ausência de bandas imunorreativas em amostras de testículo e corpo do epidídimo incubadas com o anticorpo primário pré-adsorvido com a EPPIN humana recombinante (Figura 6B, controle negativo), também dando suporte à especificidade do anticorpo utilizado.

Ambos os experimentos de RT-PCR e *Western blot* indicaram maior abundância na expressão da EPPIN no corpo do epidídimo, em comparação com as outras regiões desse

órgão (Figura 6A, B). De acordo com esta observação, a análise qPCR absoluta mostrou que o transcrito *Eppin* foi ~3 e ~5 vezes maior no segmento inicial e corpo do epidídimo quando comparado às regiões da cabeça e cauda, respectivamente (Figura 6C, D).

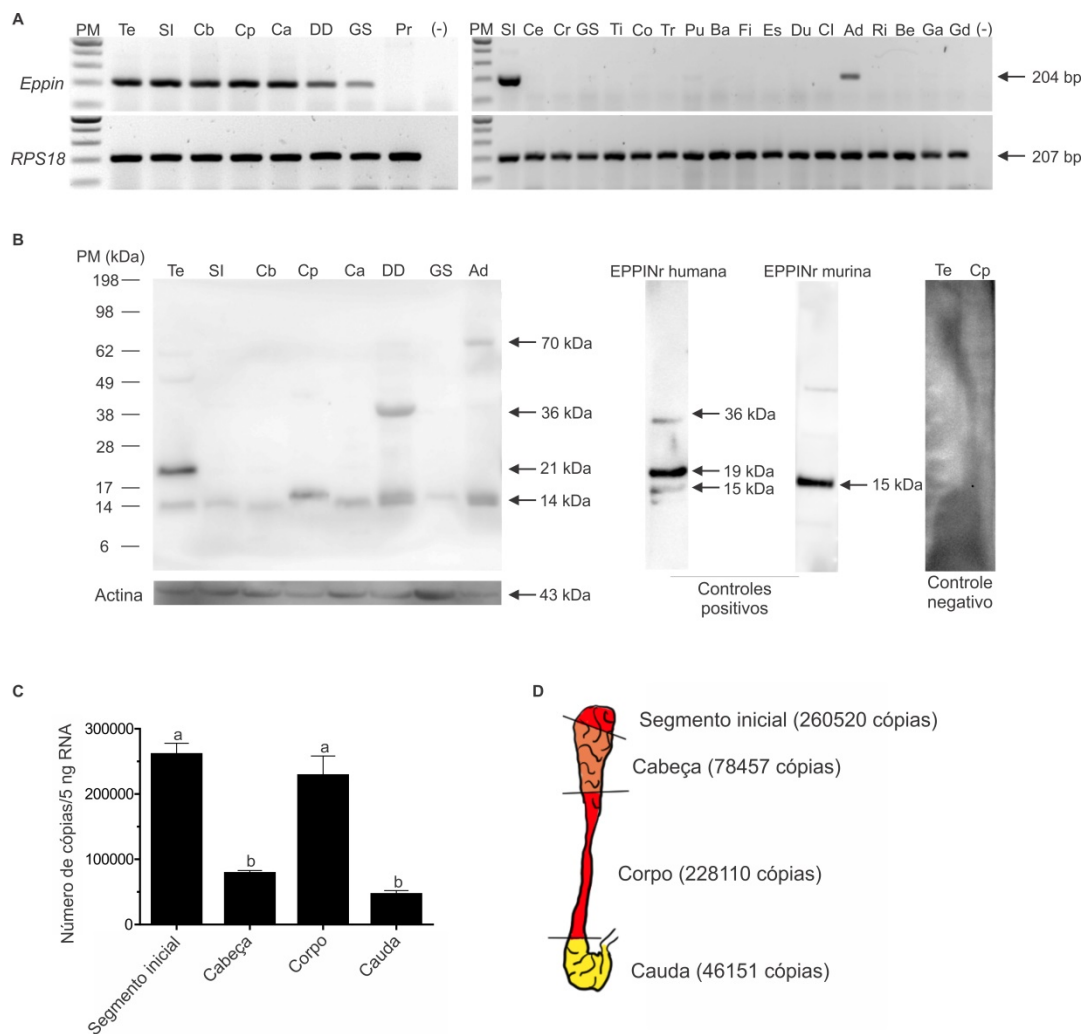


Figura 6. Perfil de expressão da EPPIN em órgãos reprodutivos e não reprodutivos de camundongos adultos (90 dias). **(A)** Imagens invertidas representativas de géis de agarose mostrando a detecção de mRNA da *Eppin* por RT-PCR. Testículo (Te), segmento inicial do epidídimo (SI), cabeça do epidídimo (Cb), corpo do epidídimo (Cp), cauda do epidídimo (Ca), ducto deferente (DD), glândula seminal (VS), próstata (Pr), cérebro (Ce), cerebelo (Cr), glândula salivar (GS), timo (Ti), coração (Co), traqueia (Tr), pulmão (Pu), baço (Ba), fígado (Fi), estômago (Es), duodeno (Du), cólon (Cl), glândula adrenal (GA), rim (Ri), bexiga (Be), gastrocnêmio (Ga), gordura do epidídimo (Ge). PM indica uma escada padrão de 100 pares de bases (pb). **(B)** Detecção da EPPIN por *Western blot* utilizando anticorpo anti-EPPIN Q20E e extratos proteicos totais de tecidos de camundongos adultos machos que mostraram positividade para o transcrito *Eppin* como apresentado em (A). Setas indicam bandas imunorreativas de ~14, ~21, ~36 e ~70 kDa nos tecidos analisados. A especificidade do anticorpo para a EPPIN foi demonstrada após incubação do anticorpo em amostras de EPPIN humana e murina recombinantes (controles positivos). O controle negativo foi realizado com anticorpo primário pré-adsorvido com EPPIN recombinante (painel direito). Detecção da actina foi usada como controle endógeno das amostras utilizadas. PM indica escala padrão de proteína (kDa). Os resultados em (A) e (B) são representativos de experiências realizadas com três camundongos. **(C)** Análise de PCR em tempo real mostrando o número de cópias/5 ng de RNA do transcrito *Eppin* no segmento inicial (SI), cabeça (Cb), corpo (Cp) e cauda (Ca) do epidídimo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; ANOVA seguida do pós-teste de Tukey). Os resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = 5$ /grupo). **(D)** Mapa de calor mostrando a expressão do transcrito *Eppin* nas diferentes regiões do epidídimo, de acordo com os resultados apresentados em (C). Amarelo indica o menor nível de expressão, laranja, nível intermediário e vermelho, alto nível de expressão.

4.1.2. A EPPIN é expressa por células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica no testículo e células epiteliais no epidídimo de camundongos machos adultos

Com o foco na caracterização da distribuição celular da EPPIN, realizamos ensaios de imuno-histoquímica no testículo, epidídimo, glândula seminal e glândula adrenal de camundongos adultos. No testículo, detectamos imunomarcação positiva para a EPPIN nos compartimentos epitelial e luminal dos túbulos seminíferos, independente da fase da espermatogênese (Figura 7A). No epitélio seminífero, observamos imunomarcação para a EPPIN no citoplasma de algumas células de Sertoli e de espermatócitos primários, espermátides iniciais (redondas) e tardias (alongadas), mas não em espermatogônias (Figura 7B). Células peritubulares e intersticiais não apresentaram imunomarcação para a EPPIN (Figura 7A, B).

No epidídimo, observamos imunomarcação positiva para EPPIN nas células principais do epitélio em todas as regiões (Figura 7B-E), bem como nas células apicais e basais do segmento inicial e cabeça (Figura 7B, C). A abundância de imunomarcação positiva para EPPIN foi maior no compartimento epitelial do corpo epididimário em comparação às outras regiões do epidídimo (figura 7C-E). Além disso, imunomarcação positiva para EPPIN foi observada em espermatozoides luminiais presentes no epidídimo (Figura 7D, E). Não foi observada nenhuma imunomarcação no espaço intersticial e na musculatura lisa que envolve o ducto epididimário. A especificidade das imunomarcações foi confirmada pela ausência de marcação quando incubamos as lâminas com o anticorpo primário pré-adsorvido com a EPPIN humana recombinante (Figura 7, C-E, insertos).

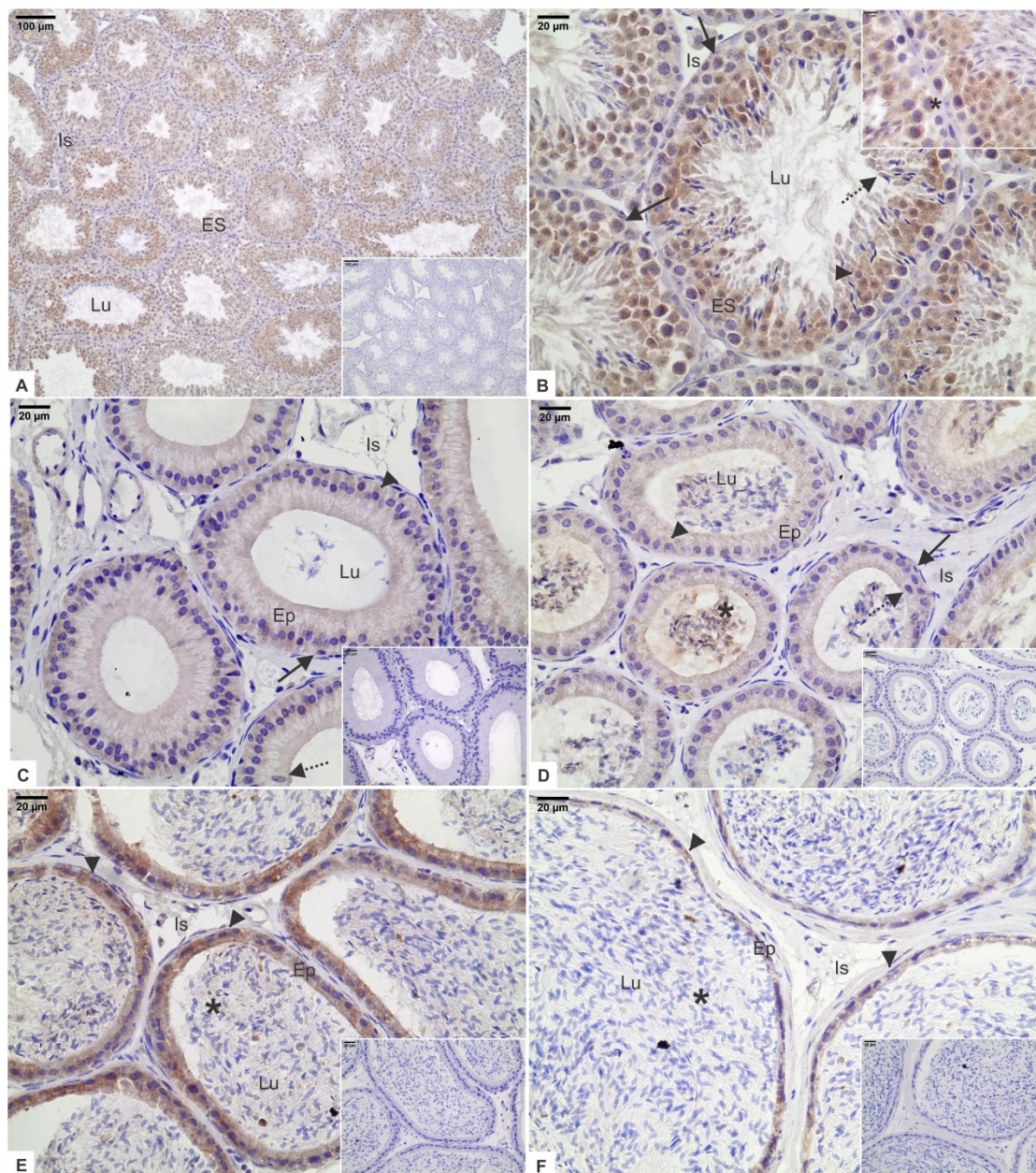


Figura 7. Localização imuno-histoquímica da EPPIN no testículo (A,B) e epidídimo (C-F) de camundongos adultos. (A) Imagem representativa em menor aumento mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN nos túbulos seminíferos, destacada em marrom. Imagem representativa no aumento de 100x evidenciando imunomarcagem para EPPIN em célula de Sertoli (inserto superior, asteriscos). (B) Imagem representativa em maior aumento mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN em espermatócitos primários (seta fechada preta), espermátides redondas (cabeça de seta) e alongadas (seta pontilhada preta). (C-F) Imagens representativas mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN no segmento inicial (C), cabeça (D), corpo (E) e cauda (F) do epidídimo. Imunomarcagem positiva para a EPPIN na região supranuclear/apical (seta pontilhada preta) e na região basal (seta fechada preta) das células epiteliais do segmento inicial e cabeça do epidídimo, no citoplasma de células principais de todas as regiões do epidídimo em forma de *puncta* (cabeça de seta preta) e nos espermatozoides luminiais (asterisco preto). Controle negativo foi realizado com anticorpo primário previamente incubado com EPPIN recombinante (insertos). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Lu: lúmen; ES: epitélio seminífero; Ep: epitélio; Is: interstício. Barra de escala: 100 µm em A, 10 µm no inserto superior em A e 20 µm em B-F.

4.1.3. A EPPIN é expressa nas células epiteliais da glândula seminal e nas células do córtex e medula da glândula adrenal

Na glândula seminal, observamos imunomarcção positiva para a EPPIN no citoplasma de células epiteliais tanto na curvatura primária quanto secundária do epitélio (Figura 8A, B). Células intersticiais e da musculatura lisa não apresentaram imunomarcção positiva para a EPPIN (Figura 8A, B). O conteúdo luminal do órgão também não apresentou sinais evidentes de imunomarcção positiva para essa proteína (Figura 8A, B).

Na glândula adrenal, observamos imunomarcção positiva para a EPPIN no córtex e medula (Figura 8C-F). No córtex da glândula adrenal, a imunomarcção foi detectada no citoplasma de células presentes nas zonas glomerulosa (periférica), fasciculada (central) e, em menor quantidade na zona reticulada (interna) (Figura 8D, E). Na medula da glândula adrenal, observamos intensa imunomarcção para a EPPIN no citoplasma das células cromafins, derivadas da crista neural embrionária (Figura 8F).

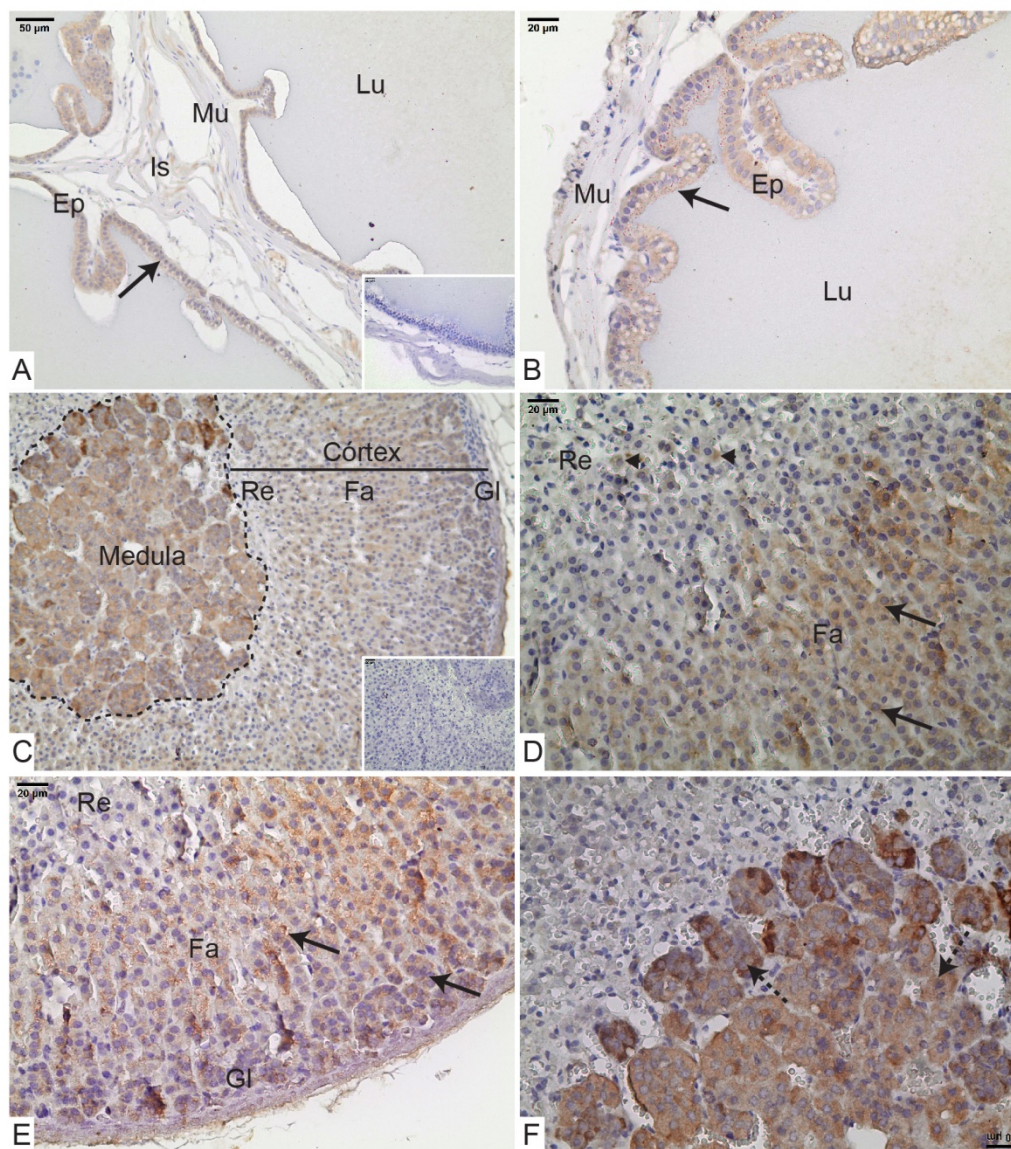


Figura 8. Localização imuno-histoquímica da EPPIN na glândula seminal (A, B) e glândula adrenal (C-F) de camundongos adultos. (A, B) Imagens representativas da imunomarcagem positiva para a EPPIN no citoplasma das células epiteliais (seta) da região distal da glândula seminal. Lu: lúmen; Ep: epitélio; Is: interstício; e Mu: músculo liso. (C) Imagem representativa em menor aumento mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN nas células da medula e córtex adrenal. (D, E) Imagem representativa em maior aumento mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN no citoplasma de células das zonas glomerulosa, fasciculada (seta) e reticulada (cabeça de seta) do córtex adrenal. (F) Imagem representativa em maior aumento mostrando imunomarcagem positiva para a EPPIN no citoplasma das células cromafins (seta pontilhada) da medula adrenal. Re: zona reticulada; Fa: zona fasciculada; Gl: zona glomerulosa. Controle negativo foi realizado com anticorpo primário previamente incubado com EPPIN recombinante (insertos em A e C). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Barra de escala: 50 μm em A e C, e 20 μm em B-F.

4.1.4. A imunolocalização da EPPIN no espermatozoide murino sofre alterações durante o seu trânsito do testículo até a cauda do epidídimo

Nossos ensaios de *Western blot* utilizando anticorpo anti-EPPIN Q20E confirmaram a expressão da EPPIN em espermatozoides coletados do segmento inicial/cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Figura 9A). Observamos a presença de duas bandas imunorreativas com massas moleculares aparentes de ~14 kDa (de maior intensidade) e ~19 kDa (de menor intensidade) (Figura 9A). Não detectamos nenhuma banda imunorreativa quando as membranas foram incubadas com anticorpo primário pré-adsorvido com EPPIN humana recombinante (Figura 9A, controle negativo).

Nossos ensaios de imunofluorescência revelaram fraca imunomarcacão para EPPIN no flagelo de espermatozoides coletados do testículo e do segmento inicial do epidídimo (Figura 9B). Essa imunomarcacão tornou-se mais intensa nos espermatozoides isolados da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, nos quais observamos a presença da EPPIN tanto na peça intermediária quanto nas peças principal e final do flagelo (Figura 9B). Os espermatozoides coletados do corpo e da cauda do epidídimo mostraram evidente imunomarcacão para EPPIN nas regiões do acrossoma anterior e pós-acrossomal (Figura 9B).

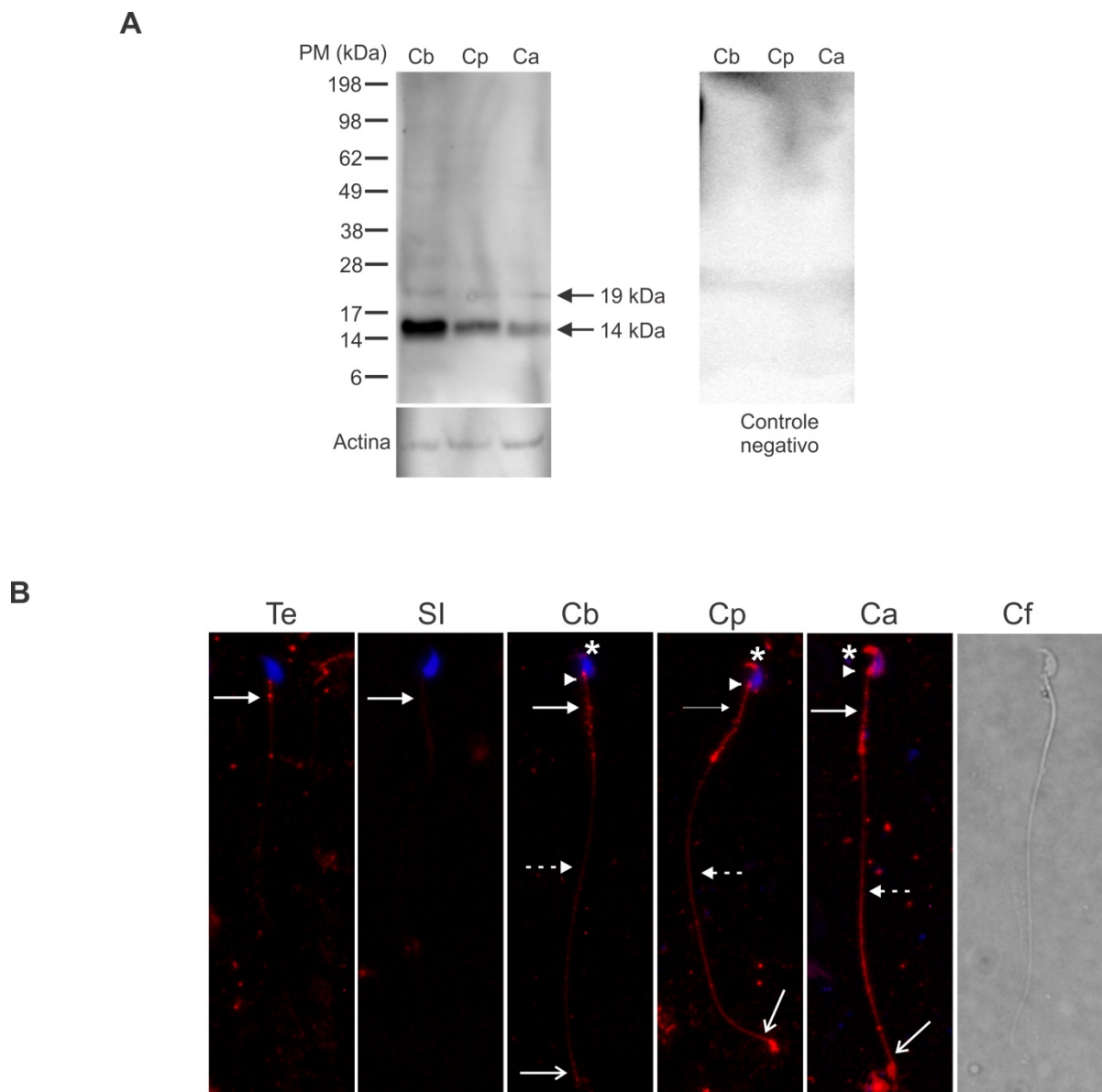


Figura 9: Efeito da maturação espermiática sobre a expressão e distribuição celular da EPPIN em espermatozoides testiculares e epididimários. **(A)** Detecção da EPPIN por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais de espermatozoides da cabeça (incluindo segmento inicial), corpo e cauda do epidídimo. As setas indicam as bandas de ~14 e ~19 kDa imunorreativas para o anticorpo anti-EPPIN Q20E. O controle negativo foi realizado com anticorpo primário pré-adsorvido com EPPIN recombinante (painel da direita). O anticorpo contra actina foi utilizado como controle interno. PM indica padrão de peso molecular. **(B)** Detecção da EPPIN em espermatozoides em diferentes estágios de maturação isolados do testículo e das diferentes regiões do epidídimo por imunofluorescência. Imunomarcagem para a EPPIN em vermelho presente no acrossoma anterior (asterisco), região pós-acrossômica (cabeça de seta), peça intermediária (seta pontilhada), principal (seta sólida) e final (seta aberta) do flagelo dos espermatozoides. O núcleo das células foi corado com DAPI em azul. Testículo: T; segmento inicial: SI, cabeça: Cb, corpo: Co; e cauda: Cd; CF: contraste de fase de espermatozoides da cauda do epidídimo. Os resultados são representativos de experimentos independentes realizados com espermatozoides de 3 camundongos. Barra de escala: 50 μ m.

4.1.5 A maturação sexual exerce impacto positivo na expressão da *EPPIN* no testículo, epidídimo e glândula seminal de camundongos

Observamos aumento da expressão relativa do transcrito *Eppin* no testículo (Figura 10A, B), no epidídimo (Figura 10C, D) e na glândula seminal (Figura 10E) durante a maturação sexual. No testículo, os ensaios de qPCR demonstraram aumento de 5 vezes na expressão relativa do transcrito *Eppin* em camundongos de 20 dias quando comparados aos camundongos de 10 dias de idade (Figura 10A). Além disso, observamos que a expressão desse transcrito foi aumentada em camundongos com 40 dias de idade em comparação com animais de 10 e 20 dias de vida (Figura 10A). A expressão relativa do transcrito *Eppin* estabilizou a partir dos 40 dias de idade, uma vez que não detectamos diferença entre camundongos com 40, 60 e 90 dias de idade (Figura 10A). Consistentemente com nossos dados de qPCR, detectamos o mesmo padrão de expressão quando comparamos a abundância de bandas em amostras de cDNA dos testículos de camundongos em diferentes idades pelo ensaio de PCR convencional (Figura 10B).

No epidídimo, ensaios de qPCR demonstraram aumento de 77 vezes nos níveis relativos do transcrito *Eppin* no epidídimo inteiro de camundongos com 20 dias quando comparados aos camundongos com 10 dias de idade (Figura 10C). Análises da expressão relativa dos níveis do transcrito *Eppin* de acordo com cada região do epidídimo revelaram aumento no segmento inicial de animais com 90 dias quando comparados aos camundongos com 60 dias de idade (Figura 10D). Em contraste, os níveis relativos de RNAm *Eppin* permaneceram inalterados quando comparamos os segmentos cabeça, corpo e cauda do epidídimo de animais com 40, 60 e 90 dias de idade (Figura 10D).

Na glândula seminal, detectamos aumento de 4 vezes na expressão relativa do transcrito *Eppin* em camundongos de 40 e 60 dias quando comparados aos camundongos de 20 dias de idade, e 5 vezes na expressão relativa do transcrito *Eppin* em camundongos de 90 dias quando comparados aos animais de 20 dias (Figura 10E). Não detectamos nenhuma diferença na expressão desse transcrito na glândula seminal de camundongos a partir de 40, 60 e 90 dias de idade (Figura 10E).

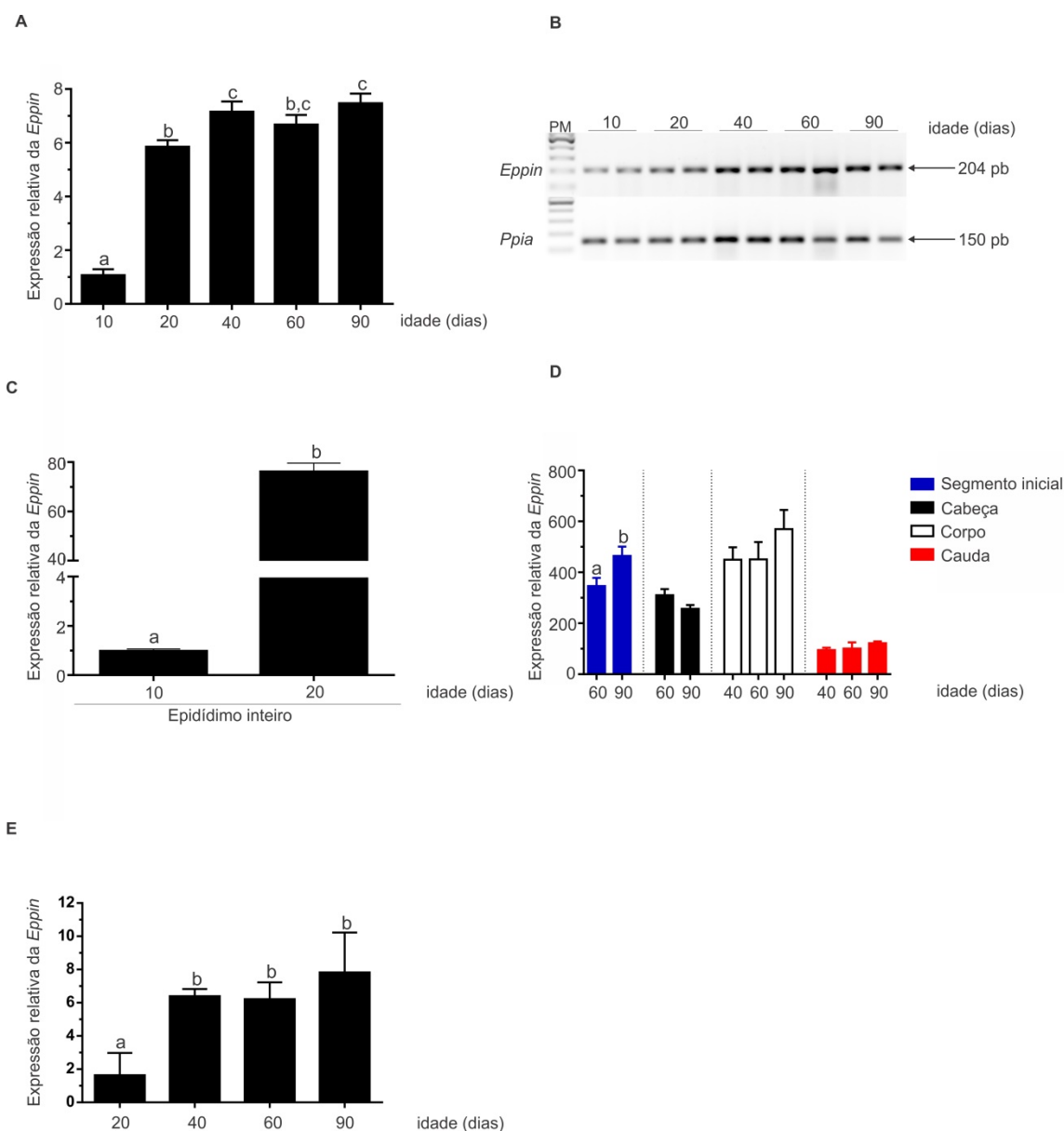


Figura 10. Impacto da maturação sexual na expressão do transcrito *Eppin* no testículo e epidídimo de camundongos. **(A)** Expressão relativa do transcrito *Eppin* no testículo de camundongos em diferentes estágios de maturação sexual (10, 20, 40, 60 e 90 dias de idade). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Ppia* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de RNAm alvo determinada no grupo de 10 dias de idade. Os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 5$ animais / grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA seguida do pós-teste de Tukey). **(B)** Imagem invertida da eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para a detecção do transcrito *Eppin* nos testículos de camundongos de 10, 20, 40, 60 e 90 dias de idade. Expressão relativa do transcrito *Eppin* no epidídimo inteiro **(C)** e **(D)** em cada segmento do epidídimo de camundongos em diferentes estágios de maturação sexual (10, 20, 40, 60 e 90 dias de idade). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Ppia* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de RNAm alvo determinada no grupo de 10 dias de idade. Os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 5$ animais / grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$; teste t de Student).

Nossos ensaios de imuno-histoquímica com amostras de testículo (Figura 11), epidídimo (Figura 12) e glândula seminal (figura 11) de camundongos de 40, 60 e 90 dias não mostraram diferença evidente na abundância e imunodistribuição da EPPIN.

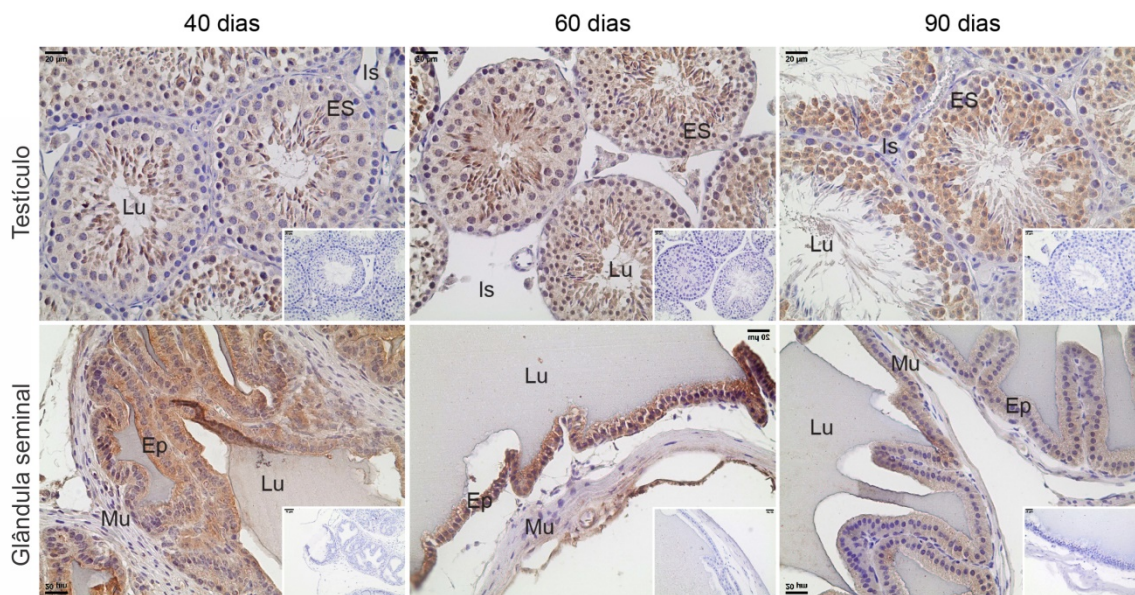


Figura 11. Impacto da maturação sexual sobre a distribuição celular da EPPIN no testículo e glândula seminal de camundongos. Imagens representativas mostrando localização imuno-histoquímica da EPPIN no testículo e glândula seminal de camundongos de 40, 60 e 90 dias de idade. Controle negativo foi realizado com anticorpo primário previamente incubado com EPPIN recombinante (insetos). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Lu: lúmen; ES: epitélio seminífero; Ep: epitélio; Is: interstício; Mu: músculo liso. Barra de escala: 20 μm.

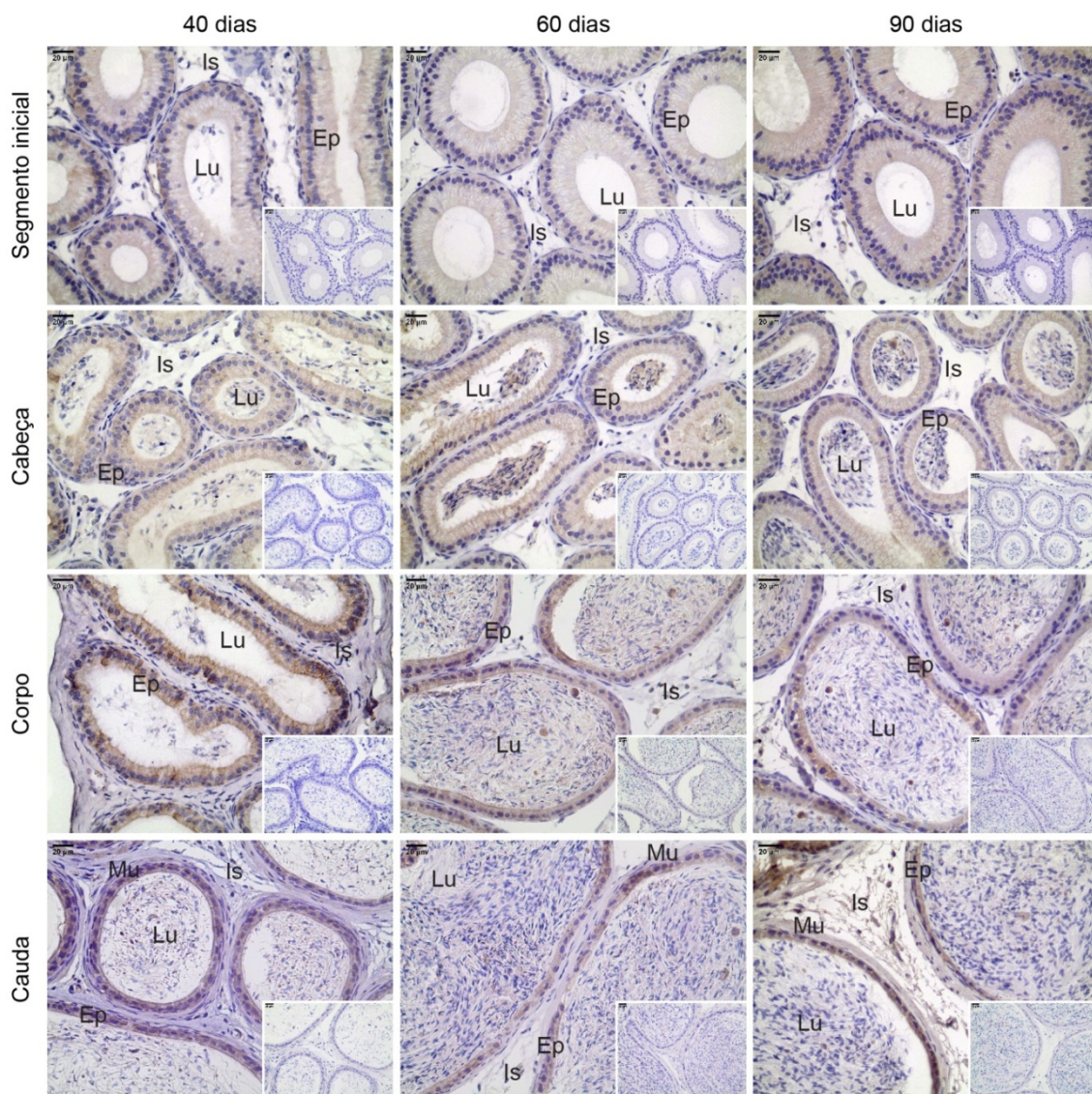


Figura 12. Impacto da maturação sexual sobre a distribuição celular da EPPIN no epidídimo de camundongos. Imagens representativas mostrando localização imuno-histoquímica da EPPIN nas diferentes regiões do epidídimo de camundongos de 40, 60 e 90 dias de idade. Controle negativo foi realizado com anticorpo primário previamente incubado com EPPIN recombinante (insertos). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Lu: lúmen; Ep: epitélio; Is: interstício; Mu: músculo liso. Barra de escala: 20 μ m.

**Capítulo 2: Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de
camundongos**

4.2. Capítulo 2: Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos

4.2.1. A EPPIN murina presente na superfície do espermatozoide possui proteínas parceiras oriundas do fluido da glândula seminal e do próprio espermatozoide

A fim de identificar potenciais parceiros de ligação à EPPIN em espermatozoides murinos maduros, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação seguida por LC-MS/MS usando anticorpo anti-EPPIN Q20E em amostras de espermatozoides isolados do corpo/cauda do epidídimo pré-incubados com a fração solúvel em tampão fosfato do fluido da glândula seminal. Primeiramente confirmamos a capacidade do anticorpo em imunoprecipitar a EPPIN por: 1) identificação de sequências peptídicas trípticas referentes à EPPIN por LC-MS/MS: ²¹GPSLADLLFPRR³², ³⁵RFREECEEHQERD⁴⁶ e ⁵⁸KCLNPQQDICSLPKD⁷² correspondentes à EPPIN de camundongos (Figura 13A, B); e 2) detecção da presença da EPPIN em amostras de imunoprecipitado através de ensaios *Western blot* usando anticorpo anti-EPPIN S21C: uma banda imunorreativa com peso molecular aparente de ~14 kDa correspondente à EPPIN foi observada (Figura 13C, linha 1). Ensaios de controle negativo não apresentaram bandas correspondentes à EPPIN (Figura 13C, linha 2-4), demonstrando a especificidade do anticorpo anti-EPPIN.

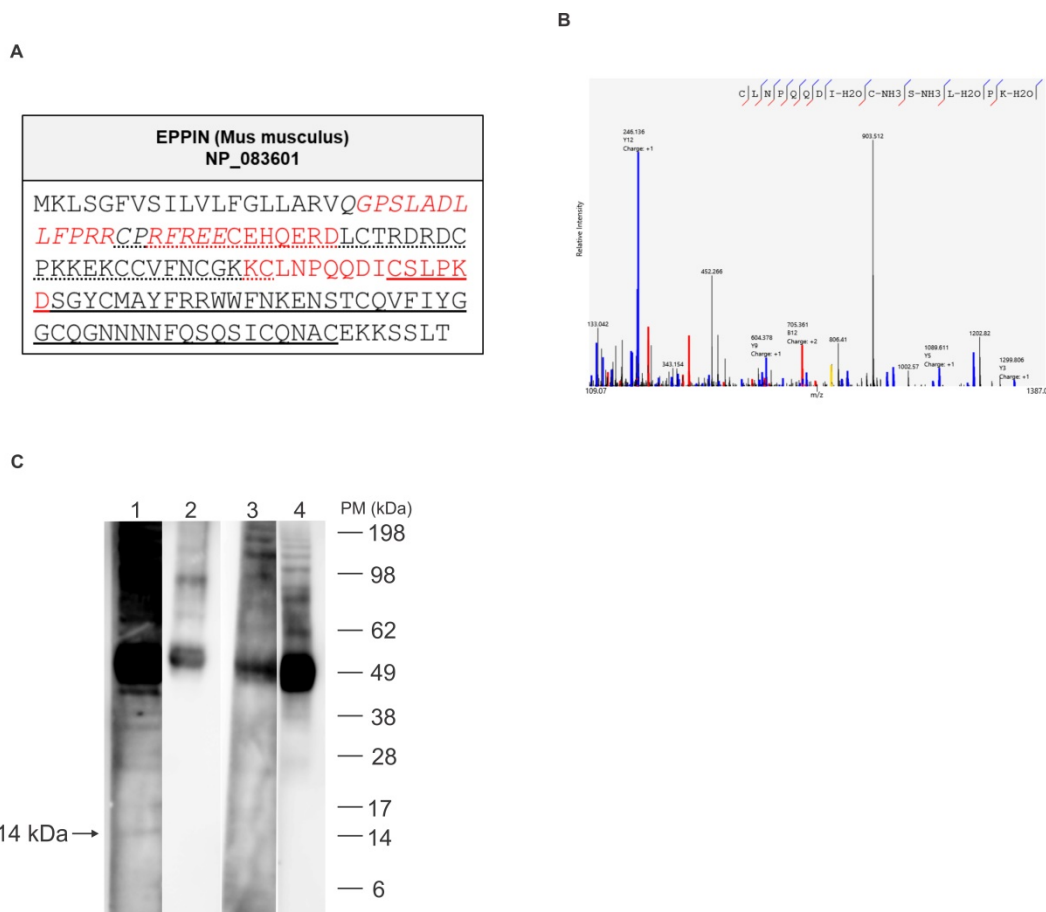


Figura 13. Identificação da EPPIN em espermatozoides obtidos do corpo/cauda do epidídimo de camundongos adultos por ensaios de co-imunoprecipitação usando anticorpo anti-EPPIN Q20E seguida de LC-MS/MS e *Western blot*. **(A)** Sequência primária da EPPIN de camundongo mostrando os peptídeos trípticos identificados por LC-MS/MS em vermelho. Os domínios WFDC e Kunitz são identificados por sublinhados pontilhados e contínuos, respectivamente. **(B)** Espectro do péptido tríptico representativo do peptídeo KCLNPQQDICS LPK correspondente aos resíduos 68-81 da EPPIN de camundongo. **(C)** *Western blot* após co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN em espermatozoides maduros de camundongo pré incubados com fluido da glândula seminal. Linha 1: Amostra imunoprecipada com anticorpo anti EPPIN Q20E e revelada com anticorpo anti-EPPIN S21C. Seta indica banda imunorreativa de ~14 kDa; Linha 2: Amostra de controle negativo imunoprecipada com Q20E e revelada com IgG de coelho; Linha 3: Amostra de controle negativo imunoprecipada com IgG de coelho e revelada com anticorpo anti-EPPIN S21C; Linha 4: amostra de controle negativo imunoprecipada com anticorpo anti-EPPIN Q20E e revelada apenas com anticorpo secundário. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes realizados com espermatozoides de 2-3 camundongos por experimento.

Os peptídeos trípticos identificados pela espectrometria de massas foram correspondentes a proteínas com duas origens distintas: proteínas com origem do fluido da glândula seminal e proteínas intrínsecas do próprio espermatozoide. Em pelo menos dois dos três experimentos independentes realizados, detectamos proteínas provenientes do fluido da glândula seminal: SVS2 (Figura 14A-C; n=3), SVS3a (Figura 14D-F; n=2), SVS5 (Figura 15A, B; n=3) e SVS6 (Figura 15C, D; n=3), e proteínas intrínsecas do próprio

espermatozoide: GAPDS (Figura 16A, B; n=3) e VDAC2 (Figura 16C, D; n=3). Na Tabela S1 mostramos uma lista de outras proteínas identificadas por LC-MS/MS em pelo menos dois dos três experimentos independentes realizados. Agrupamos as proteínas encontradas em 3 grupos funcionais: função reprodutiva, função imunológica e participação em vias de sinalização celular, bem como 9 subgrupos: regulação positiva da motilidade espermática, formação de plugue copulatório, regulação positiva ou negativa da capacitação, desfosforilação do fosfatidilinositol, inibição de serino proteases, ação antimicrobiana e regulação positiva da reação acrossômica (Tabela S1).

Em relação às SVS2 e SVS3a, proteínas de origem da glândula seminal, também realizamos ensaios de *Western blot* nas amostras após a co-imunoprecipitação. Usando anticorpo anti-SVS2 detectamos uma banda imunorreativa com peso molecular aparente de ~45 kDa correspondente à SVS2 (Figura 14C, linha 1). Não observamos a presença desta banda imunorreativa quando foi realizada imunoprecipitação com IgG de coelho substituindo o anticorpo anti-EPPIN Q20E (Figura 14C, linha 2) ou quando foram realizados ensaios de *Western blot* usando o anticorpo anti-SVS2 pré-incubado com peptídeo bloqueador (Figura 14C, linha 3).

Usando anticorpo anti-SVS3 detectamos uma banda imunorreativa com peso molecular aparente de ~31 kDa correspondente à SVS3 (Figura 14F, linha 1). Não observamos a presença desta banda imunorreativa quando foi realizada imunoprecipitação com IgG de coelho substituindo o anticorpo anti-EPPIN Q20E (Figura 14F, linha 2) ou quando foram realizados ensaios de *Western blot* usando o anticorpo anti-SVS3 pré-incubado com peptídeo bloqueador (Figura 14F, linha 3).

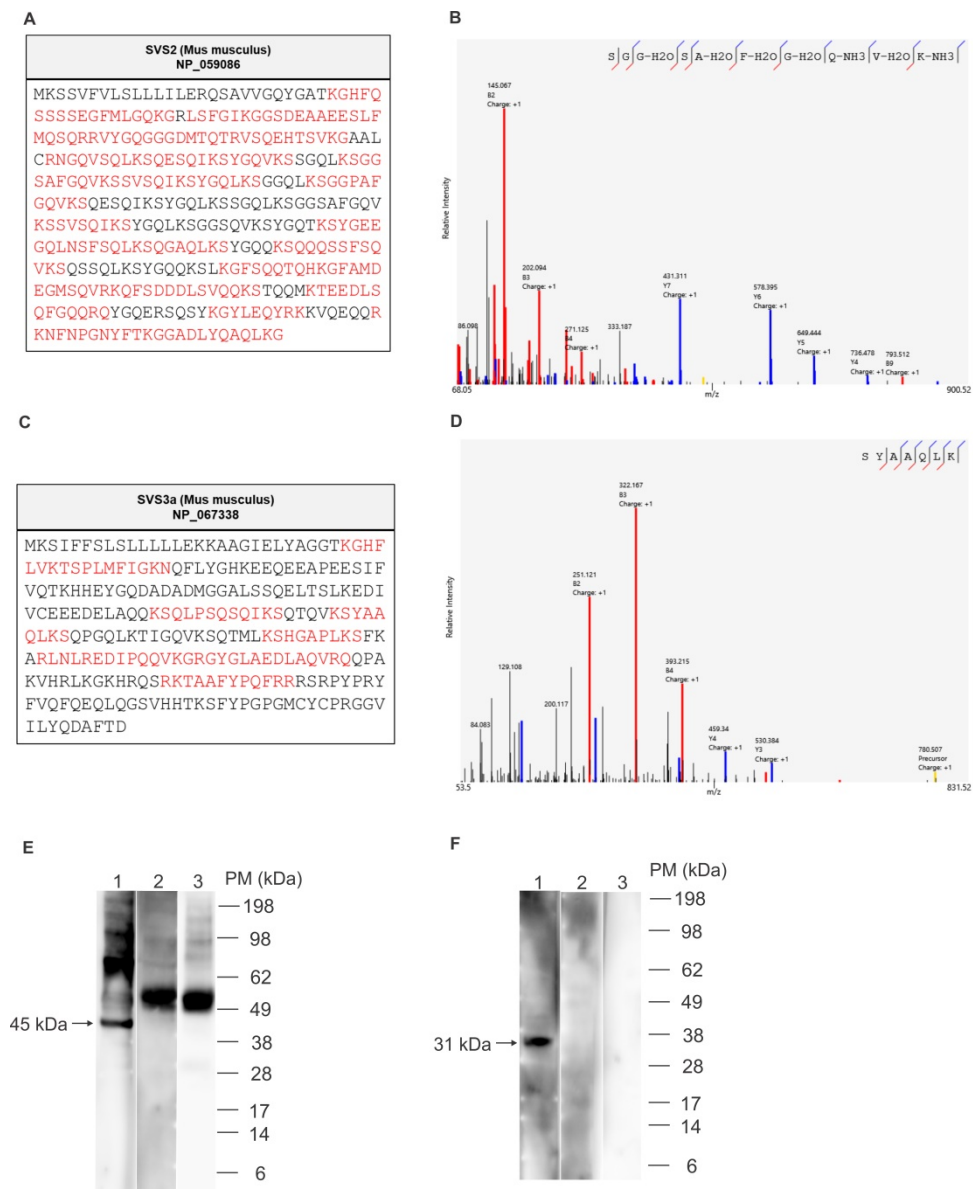


Figura 14. Identificação da SVS2 e SVS3a em espermatozoides obtidos do corpo/cauda do epidídimo de camundongos adultos por ensaios de co-imunoprecipitação usando anticorpo anti-EPPIN Q20E seguida de LC-MS/MS e *Western blot*. **(A)** Sequência primária da SVS2 de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(B)** Espectro do peptídeo triptico representativo do peptídeo KSGGSAFGQVKS correspondente aos resíduos 125-136 da SVS2 de camundongo. **(C)** Sequência primária da SVS3a de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(D)** Espectro do peptídeo triptico representativo do peptídeo KSYAAQLKS correspondente aos resíduos 124-132 da SVS3a de camundongo. **(E)** *Western blot* da SVS2 após co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN em espermatozoides maduros de camundongo pré incubados com fluido da glândula seminal. Linha 1: Amostra imunoprecipada com anticorpo anti-EPPIN Q20E e revelada com anticorpo anti-SVS2. Seta indica banda imunorreativa de ~45 kDa; Linha 2: Amostra de controle negativo imunoprecipitada com IgG de coelho e revelada com anticorpo anti-SVS2; Linha 3: amostra de controle negativo imunoprecipitada com anti-EPPIN Q20E e revelada com anticorpo anti-SVS2 incubada com um excesso molar de 30x do peptídeo da SVS2. Os resultados são representativos de três experimentos realizados com espermatozoides de dois a três camundongos por experimento. **(F)** *Western blot* da SVS3 após co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN em espermatozoides maduros de camundongo pré incubados com fluido da glândula seminal. Linha 1: Amostra imunoprecipada com anticorpo anti-EPPIN Q20E e revelada com anticorpo anti-SVS3. Seta indica banda imunorreativa de ~31 kDa; Linha 2: Amostra de controle negativo imunoprecipitada com IgG de coelho e revelada com

anticorpo anti-SVS3; Linha 3: amostra de controle negativo imunoprecipitada com anti-EPPIN Q20E e revelada com anticorpo anti-SVS3 incubada com um excesso molar de 30x do peptídeo da SVS3. Os resultados são representativos de três experimentos realizados com espermatozoides de dois a três camundongos por experimento.

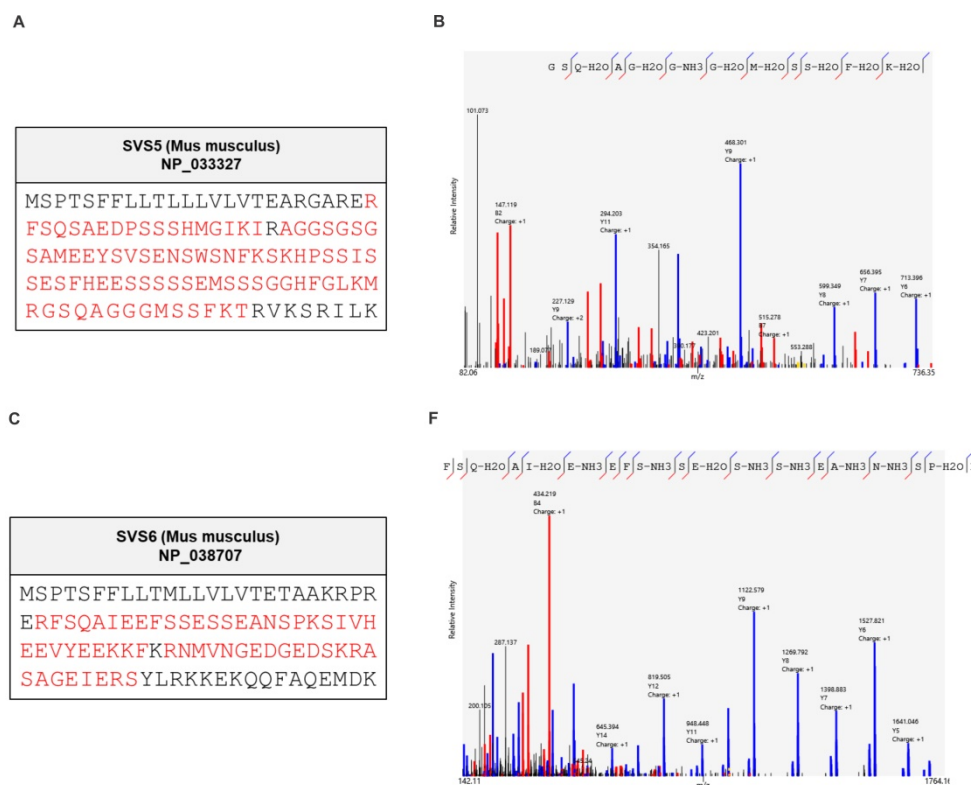


Figura 15. Identificação da SVS5 e SVS6 por espectrometria de massas LC-MS/MS após co-imunoprecipitação usando anticorpo anti-EPPIN Q20E e espermatozoides do corpo/cauda do epidídimo de camundongos adultos. **(A)** Sequência primária da SVS5 de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(B)** Espectro do peptídeo tríptico representativo do peptídeo RGSQAGGGMSSFKT correspondente aos resíduos 101-114 da SVS5 de camundongo. **(C)** Sequência primária da SVS6 de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(D)** Espectro do peptídeo tríptico representativo do peptídeo RFSQAIEEFSSSESEANSPKS correspondente aos resíduos 27-47 da SVS6 de camundongo.

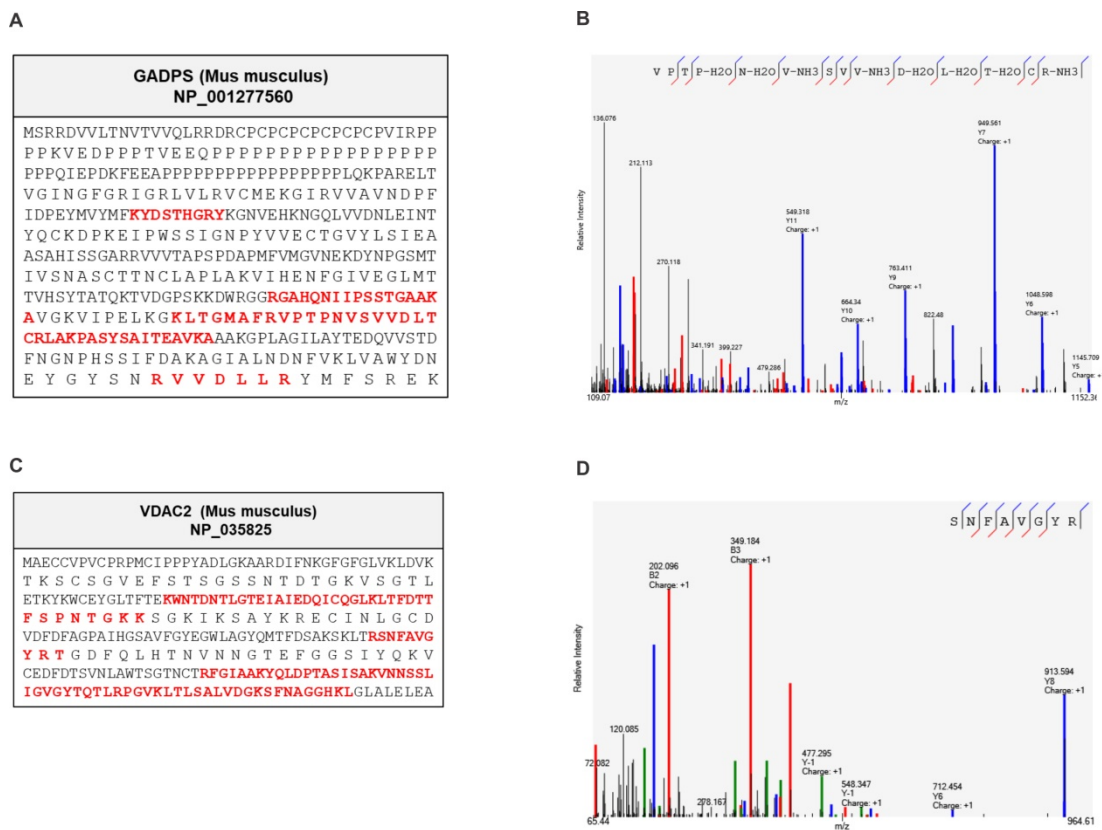


Figura 16. Identificação de GAPDSH e VDACC2 por espectrometria de massas a partir de ensaios de co-imunoprecipitação usando anticorpo anti-EPPIN Q20E e espermatozoides de corpo/cauda epidídimo de camundongos adultos. **(A)** Sequência primária da GADPS de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(B)** Espectro de peptídeo triptico representativo do peptídeo RVPTPNVSVDLTCRL correspondente aos resíduos 338-353 de GADPS de camundongo. **(C)** Sequência primária do VDACC2 de camundongo mostrando os peptídeos identificados por LC-MS/MS em vermelho. **(D)** Espectro de peptídeo triptico representativo do peptídeo RSNFAVG YRT correspondente aos resíduos 178-187 do VDACC2 de camundongo.

Em adição, realizamos ensaios de *Far western blot* para confirmar a interação entre a EPPIN e a SVS2. A incubação da EPPIN (fixa na membrana) com a SVS2 em solução, seguida de *Western blot* com o anticorpo anti-SVS2 gerou a presença de bandas imunorreativas com massas moleculares aparentes de ~26, 36 e 60 kDa (Figura 17A). A incubação da SVS2 (fixa na membrana) com a EPPIN em solução, seguida de *Western blot* com anticorpo anti-EPPIN Q20E resultou na detecção de banda imunoreativa com massa molecular aparente de ~44 kDa (Figura 17B). Não observamos nenhuma banda imunoreativa nos ensaios de controle negativo (EPPIN sem incubação com SVS2 ou BSA incubada com SVS2) demonstrando a especificidade da ligação dos anticorpos anti-SVS2 e

anti-EPPIN Q20E, respectivamente (Figura 17). Em conjunto, esses resultados confirmam a existência de interação entre essas proteínas.

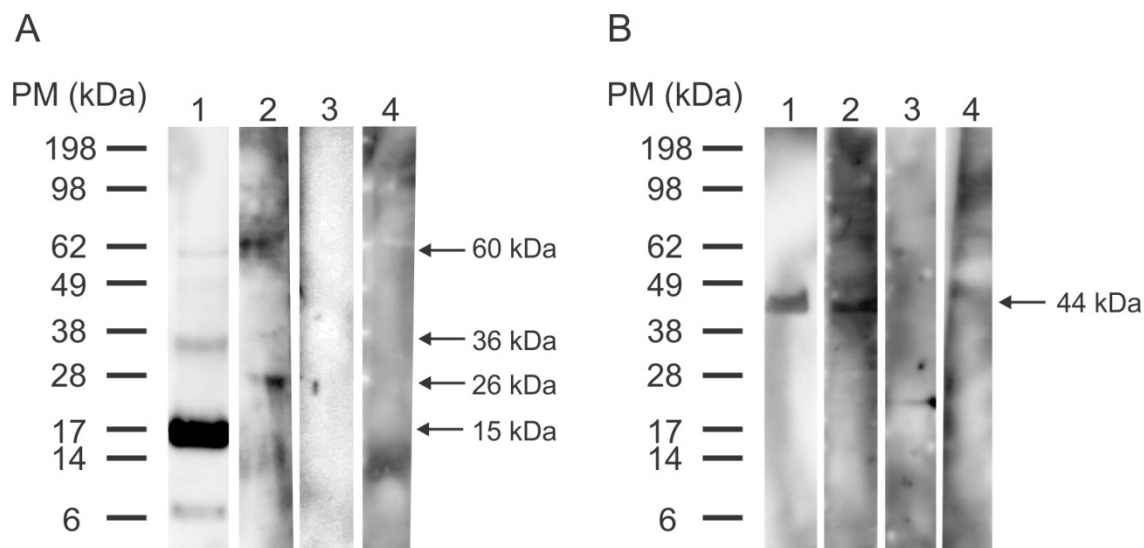


Figura 17. Interação entre EPPIN e SVS2 *in vitro*. **A)** *Far Western blot* demonstrando que a SVS2 se liga à EPPIN. **Linha 1)** Detecção da EPPIN com anticorpo anti-EPPIN Q20E. **Linha 2)** Detecção da interação entre EPPIN-SVS2 após incubação da SVS2 recombinante na membrana referente à EPPIN recombinante e posterior incubação com anticorpo anti-SVS2. **Linha 3)** A especificidade do anticorpo anti-SVS2 foi confirmada após incubação da membrana referente à EPPIN sem a presença de SVS2. **Linha 4)** A especificidade da interação EPPIN-SVS2 foi confirmada após incubação da membrana referente à BSA com SVS2 recombinante e posterior incubação com anticorpo anti-SVS2. Setas indicam bandas imunorreativas de ~15, ~25 e ~35 kDa (Linha 1 e 2). **B)** *Far Western blot* demonstrando que a EPPIN se liga à SVS2. **Linha 1)** Detecção da SVS2 com anticorpo anti-SVS2. **Linha 2)** Detecção da interação entre SVS2 e EPPIN após incubação da EPPIN recombinante na membrana referente à SVS2 recombinante e posterior incubação com anticorpo anti-EPPIN Q20E. **Linha 3)** A especificidade do anticorpo anti-EPPIN foi confirmada após incubação da membrana referente à SVS2 sem a SVS2. **Linha 4)** A especificidade da interação SVS2-EPPIN foi confirmada após incubação da membrana referente à BSA com EPPIN recombinante e posterior incubação com anticorpo anti-EPPIN Q20E. Seta indica banda imunorreativa de ~44 kDa (Linha 1 e 2). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Com base nos nossos resultados a respeito das potenciais proteínas que interagem com a EPPIN murina na superfície do espermatozoide, construímos redes de interações proteína-proteína referentes às proteínas do fluido da glândula seminal (Figura 18), intrínsecas do próprio espermatozoide (ver figura suplementar S1) e de ambos os casos (ver figura suplementar S2). De acordo com a plataforma “STRING” e levando em consideração as proteínas secretadas pela glândula seminal, a EPPIN atua na superfície do espermatozoide por ligação direta com a SVS2 e indiretamente com a SVS3a, SVS5 e

SVS6 via SVS2 (Figura 18). Em contrapartida, ao serem avaliadas possíveis interações entre a EPPIN e proteínas do próprio espermatozoide, a plataforma "STRING" não demonstrou afinidade entre as proteínas (ver Figura suplementar S2).

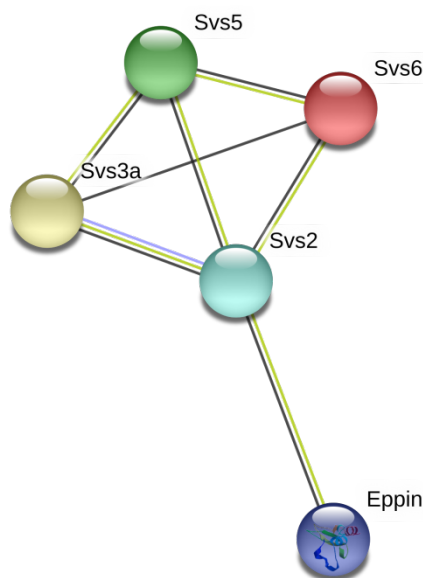


Figura 18. Rede de interação entre as potenciais proteínas de interação da EPPIN provenientes do fluido da glândula seminal mostrando interação direta entre EPPIN e SVS2 e interação indireta com SVS3a, SVS5 e SVS6. EPPIN: inibidor da protease do epidídimo; SVS2: Proteína secretada pela glândula seminal 2; SVS3a: Proteína secretada da glândula seminal 3 isoforma a; SVS5: Proteína secretada pela glândula seminal 5 e SVS6: Proteína secretada pela glândula seminal 6. A rede de interação foi construída usando a plataforma "STRING: redes de associação de proteínas funcionais".

Discussão

5. Discussão

No presente estudo, caracterizamos o perfil de expressão da EPPIN em tecidos e no espermatozoide de camundongos, ampliando a sua expressão para outros órgãos em adição ao testículo e epidídimo e identificamos potenciais parceiros de ligação da EPPIN no espermatozoide murino. Nossos achados fornecem suporte para afirmar que o camundongo é um modelo experimental pré-clínico adequado para estudos *in vivo* da EPPIN e dos potenciais fármacos que podem produzir efeitos contraceptivos interagindo com essa proteína espermática. De fato, nossos resultados demonstram que a EPPIN atua como elemento espermático central para uma rede de interação proteína-proteína que pode ter papel crucial para a função espermática em camundongos. Dessa forma, a validação do camundongo como modelo experimental para os estudos da EPPIN facilitará as pesquisas em farmacologia da contracepção e conseqüentemente o avanço no desenvolvimento de uma nova estratégia contraceptiva.

Segundo Metz (METZ, 1978), os primeiros passos para o descobrimento de um alvo contraceptivo não-hormonal incluem o isolamento e caracterização do alvo seguido de uma demonstração do potencial papel desse alvo na reprodução. Atualmente, a EPPIN é um dos mais promissores alvos para o desenvolvimento de fármacos contraceptivos masculinos não hormonais que possam interferir em algum evento crucial na fisiologia normal do espermatozoide (DREVET, 2018).

5.1. Perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN em tecidos e no espermatozoide de camundongos

Estudos em humanos, ratos e camundongos indicaram expressão abundante da EPPIN no testículo e epidídimo (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; (SILVA *et al.*, 2012a) como um produto sintetizado e secretado por células de Sertoli testiculares e células epiteliais epididimárias, aparecendo na superfície do espermatozoide testicular, epididimário e ejaculado (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que as células

epiteliais do ducto deferente e da glândula seminal são fontes adicionais da EPPIN no sistema genital masculino murino. Considerando a detecção da expressão da EPPIN no ducto deferente e glândula seminal de ratos em um estudo anterior (SILVA *et al.*, 2012a), supomos que a sua expressão em órgãos reprodutivos masculinos seja conservada entre roedores. Vale ressaltar que tanto o ducto deferente como a glândula seminal têm a mesma origem embrionária do epidídimo: o ducto mesonéfrico (ROBAIRE; HINTON, 2015), sugerindo que essa estrutura embrionária contribui para a expressão da EPPIN no sistema genital masculino durante a vida pós-natal.

A presença da EPPIN na glândula seminal nos levou a pensar na hipótese de que a proteína pode ser secretada por esse órgão e posteriormente se ligar à superfície do espermatozoide durante a ejaculação. Para testar essa hipótese realizamos ensaios de imuno-histoquímica na glândula seminal e *Western blot* no fluído da glândula seminal (dado não mostrado). Os resultados não sustentaram a hipótese criada, visto que não apresentaram evidências da presença da EPPIN no fluído da glândula seminal, sugerindo que a proteína não é secretada por esse epitélio. A presença da EPPIN nas células epiteliais da glândula seminal abre novas fronteiras para o estudo das funções que essa proteína exerce no sistema genital masculino e também acerca das suas contribuições para a fisiologia da glândula seminal.

Em relação ao perfil de expressão da EPPIN em órgãos não reprodutivos, a glândula adrenal foi o único local que detectamos expressão positiva para esse alvo em camundongos machos. Podemos hipotetizar que neste local a EPPIN pode desempenhar alguns papéis como bactericida (YENUGU *et al.*, 2004; MCCRUDDEN *et al.*, 2008) e inibidor de protease (WANG *et al.*, 2007; MCCRUDDEN *et al.*, 2008), atuando como um dos membros do arsenal da imunidade inata da glândula adrenal. No entanto, estudos adicionais serão necessários para testar essas hipóteses. Além disso, a produção local de andrógenos pela zona reticular da glândula adrenal pode contribuir na indução da expressão da EPPIN nesse órgão, em consequência desse gene ser altamente dependente de andrógenos (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; WILLEMS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*,

2012a). Vale destacar que em órgãos não reprodutivos de humanos e ratos, a EPPIN foi encontrada na traquéia/pulmão e cérebro, respectivamente, mas não na glândula adrenal (SILVA *et al.*, 2012a; SCOTT *et al.*, 2017), sugerindo que fora do sistema genital masculino a EPPIN pode ser diferencialmente expressa entre as espécies.

Em nossos ensaios de *Western blot*, detectamos a presença da EPPIN em diferentes pesos moleculares de acordo com o tecido analisado. Já é conhecido que a EPPIN pode estar presente em diferentes formas, incluindo proteína completa e processada, além de diferentes formas de organização estrutural como monômeros, dímeros e oligômeros (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007; MITRA; RICHARDSON; O'RAND, 2010; SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013). Além disso, o alto ponto isoelétrico da EPPIN, em conjunto com a grande quantidade de resíduos de cisteínas em sua composição, bem como outras possíveis modificações pós-traducionais também podem contribuir para esse perfil de bandas identificado.

Nossos dados de imuno-histoquímica mostram que a EPPIN é altamente expressa nos epitélios seminífero e epididimário murinos, sendo consistente com dados anteriores da literatura (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012a). A presença da EPPIN em células de Sertoli e espermatogênicas indica a existência de múltiplas fontes dessa proteína dentro dos túbulos seminíferos. Nesse caso, a imunomarcagem positiva para EPPIN em espermatócitos e espermátides pode ser resultado da absorção da EPPIN pelas células da linhagem germinativa após secreção pelas células de Sertoli ou que as próprias células espermatogênicas sejam capazes de sintetizar a EPPIN (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007).

A ausência de imunomarcagem para a EPPIN em espermatogônias sugere que a expressão da EPPIN varia de acordo com o tipo de célula da linhagem germinativa. Em adição, é importante destacar que nossos ensaios de imuno-histoquímica demonstraram imunomarcagem positiva para a EPPIN em algumas mas não todas as células de Sertoli analisadas. Além disso, o perfil de marcação observado para essas células não foi o mesmo identificado em humanos e ratos (RICHARDSON *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2012).

Diferenças quanto ao método de fixação do tecido ou anticorpos utilizados nesses estudos podem ter contribuído para essas diferenças entre nossos resultados e o descrito na literatura. .

Em conjunto, esses dados sugerem que a EPPIN pode atuar como uma proteína multifuncional no testículo, atuando por dois caminhos: 1) modulação da espermatogênese; e 2) proteção do epitélio seminífero contra proteases liberadas por células germinativas apoptóticas, propriedade importante para a manutenção da homeostasia testicular. Dessa forma, os papéis específicos que a EPPIN pode exercer no testículo merecem uma investigação mais aprofundada. Estudos funcionais e morfológicos utilizando modelos experimentais de camundongos geneticamente modificados via deleção ou mutação da *Eppin* no testículo, poderiam fornecer evidências do papel específico da EPPIN durante o processo de espermatogênese.

Após a espermatogênese, os espermatozoides imaturos funcionalmente são transportados até o epidídimo onde vão sofrer alterações que garantem a sua maturação, principalmente por meio de interações com proteínas secretadas pelo epitélio epididimário (ROBAIRE; HINTON, 2015; SIPILÄ; BJÖRKGREN, 2016). O epidídimo apresenta um arsenal específico de proteínas secretadas no lúmen de acordo com sua segmentação (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), proporcionando ao espermatozoide um ambiente seguro e sustentável durante sua jornada através das regiões epididimárias proximais e armazenamento em estado quiescente na cauda (ROBAIRE; HINTON, 2015). Nesse contexto, a identidade, proporção e funcionalidade dessas proteínas secretadas pelo epitélio epididimário pode variar conforme a região do epidídimo e com o estágio de maturação do gameta masculino.

Nossos resultados mostram um padrão específico de expressão da EPPIN de acordo com o segmento epididimário analisado, com uma maior expressão do alvo no corpo do epidídimo tanto no nível de RNAm como a nível proteico. Corroborando com esses achados, verificamos que a presença da EPPIN no espermatozoide murino se torna mais abundante em espermatozoides coletados a partir do corpo do epidídimo, ou seja, em

espermatozoides maduros. Esse mesmo perfil de marcação para a EPPIN em amostras de espermatozoides foi demonstrado por Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2012a), que sugeriram que a EPPIN presente no espermatozoide é secretada pelo epitélio do epidídimo. Com esses achados, sugerimos que a secreção da EPPIN pelas células epiteliais ocorre em maior proporção no corpo do epidídimo devido a sua maior abundância de expressão nesse segmento em comparação às demais regiões, o que pode afetar dinamicamente sua capacidade de interagir com os espermatozoides em maturação (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012a).

Além disso, a imunomarcação positiva para a EPPIN na região acrossômica e flagelo de espermatozoides maduros suporta o papel ativo desta proteína em alguns eventos fisiológicos como reação acrossômica e motilidade espermática. Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2010) demonstraram que o bloqueio de EPPIN na superfície do espermatozoide humano com anticorpos anti-EPPIN foi capaz de inibir a reação acrossômica induzida pelo ionóforo A23187, demonstrando o potencial da EPPIN neste evento chave para a fertilização.

A análise dos níveis relativos do transcrito *Eppin* no testículo, epidídimo e glândula seminal de camundongos sexualmente imaturos e maduros revelou uma correlação positiva da expressão desse alvo de acordo com o estágio de desenvolvimento pós-natal, atingindo estabilidade na puberdade precoce. Possivelmente este evento está correlacionado com o aumento dos níveis de andrógenos no plasma, sabendo que a expressão da EPPIN é dependente de andrógenos (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012a). É conhecido que os níveis plasmáticos de testosterona em camundongos crescem rapidamente entre 15 e 40 dias de idade, aumentando gradualmente após essa idade e atingindo um platô por volta dos 100 dias de idade (WANG *et al.*, 2015). Esse dado é consistente com a regulação positiva dos níveis do transcrito *Eppin* observados no testículo, epidídimo e glândula seminal de camundongos com 10, 20 e 40 dias de idade, sem alterações significativas em animais considerados adultos. O aumento nos níveis de RNAm da *Eppin* entre camundongos com 60 e 90 dias de idade especificamente no segmento

inicial, no entanto, sugere que fatores testiculares também podem desempenhar um papel importante na regulação da *Eppin*. Além disso, é sabido que as regiões proximais do epidídimo são mais sensíveis a andrógenos (SIPILÄ; BJÖRKGREN, 2016), o que explica o achado dessa diferença somente nessa região e não nos demais seguimentos epididimários.

5.2. Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos

A compreensão do perfil de interação proteína-proteína de um alvo é um passo crucial para descobrir suas funções fisiológicas. No espermatozoide ejaculado humano, a EPPIN tem sido descrita como uma proteína central em um complexo conhecido como complexo proteico EPPIN (EPC, do inglês) (WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007). O EPC contém pelo menos três proteínas de ligação à EPPIN: LTF, CLU e SEMG1, que possuem papéis na proteção e função do espermatozoide (WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007). No presente estudo, utilizamos ensaios de co-imunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN, seguida de identificação de proteínas por LC-MS/MS, com o intuito de investigar parceiros de ligação da EPPIN em espermatozoides murinos maduros. Considerando que a EPPIN presente no espermatozoide maduro pode interagir com proteínas do plasma seminal, decidimos pré-incubar os espermatozoides com o fluido retirado das glândulas seminais para mimetizar a secreção que banha o espermatozoide durante a ejaculação. Primeiramente, confirmamos a capacidade do anticorpo anti-EPPIN Q20E em imunoprecipitar a EPPIN, como demonstrado pela presença de peptídeos trípticos e bandas imunorreativas correspondentes à EPPIN murina por LC-MS/MS e *Western blot*, respectivamente.

Entre as possíveis proteínas parceiras da EPPIN identificadas em pelo menos dois dos três experimentos independentes realizados, quatro delas (SVS2, SVS3, SVS5 e SVS6) são secretadas pelo epitélio da glândula seminal como componentes principais do sêmen de roedores (KAWANO; YOSHIDA, 2007; YOSHIDA; KAWANO; YOSHIDA, 2008). As SVSs são membros da família REST (do inglês, *rapid evolving seminal-vesicle-transcribed*),

família conhecida por desempenhar papéis na formação do coágulo do sêmen, função e proteção do espermatozoide (YOSHIDA; KAWANO; YOSHIDA, 2008). No total, sete SVSs (SVS1-SVS7) foram descritas em camundongos e apresentam várias funções, como formação do plugue copulatório (SVS1-SVS3) (MANGELS *et al.*, 2015); regulação da resposta imunológica (SVS4) (GALDIERO *et al.*, 1989); inibição da atividade de serino-proteases (SVS5 e SVS6) (CLAUSS; LILJA; LUNDWALL, 2005) e controle (estimulação ou inibição) da função espermática, incluindo motilidade (SVS7) e capacitação (SVS2 e SVS3) (KAWANO; YOSHIDA, 2007; KAWANO *et al.*, 2014; ARAKI *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a SVS2, SVS3, SVS4, SVS5 e SVS6 são codificados por genes localizados em loci gênicos ortólogos que codificam proteínas REST humanas: SEMG1 e SEMG2. A SEMG1 interage com o espermatozoide no coágulo de sêmen, atuando como um fator inibitório da motilidade, capacitação e reação acrossômica (ROBERT; GAGNON, 1995; DE LAMIRANDE *et al.*, 2001; MITRA; RICHARDSON; O'RAND, 2010; SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013). A atividade inibitória da SEMG1 sobre a motilidade espermática se dá pela sua ligação à EPPIN (WANG *et al.*, 2005; O'RAND *et al.*, 2009; MITRA; RICHARDSON; O'RAND, 2010; SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013) e somente após a degradação da SEMG1 pela serino-protease prostática PSA a motilidade do espermatozoide ejaculado humano é ativada, processo que também resulta na liquefação do sêmen (O'RAND *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que a SVS2 é considerada ortóloga à SEMG1 devido às suas semelhanças estruturais e funcionais, apesar do baixo grau de conservação na sequência primária entre essas proteínas. Além disso, a SVS2 é um fator inibitório da capacitação espermática (ARAKI *et al.*, 2016) e promove a sobrevivência espermática no útero (KAWANO *et al.*, 2014). Sabe-se que a degradação da SVS2 ligada ao espermatozoide ocorre no istmo e no oviduto, permitindo que os espermatozoides se tornem capacitados e sofram a reação acrossômica (KAWANO; YOSHIDA, 2007; KAWANO *et al.*, 2014). Camundongos *knock-out* para o gene *Svs2* são subférteis, em parte devido à ausência do coágulo do sêmen associado à morte prematura de espermatozoides antes que eles atinjam o oviduto (KAWANO *et al.*, 2014). Recentemente, Araki *et al.* (ARAKI *et al.*, 2016)

demonstraram que a SVS3 murina atua facilitando os efeitos inibitórios da SVS2 sobre a capacitação espermática *in vitro*. Assim como a SVS2, a SVS3 possui resíduo de cisteína em sua estrutura primária, característica estrutural que não é encontrada nas demais proteínas SVS's murinas. Esses dados sustentam a hipótese de uma ação sinérgica entre proteínas SVS's no controle da função espermática (ARAKI *et al.*, 2016).

Nossa abordagem de bioinformática em conjunto com os dados de Far-Western blot permitiram investigar interação direta entre a EPPIN e SVS2. Em contrapartida, verificamos interação indireta da SVS3, SVS5 e SVS6 com a EPPIN via SVS2. Assim, nossos dados suportam a hipótese da SVS2 ser ortóloga à SEMG1, uma vez que a EPPIN emerge como uma proteína parceira de ligação da SEMG1 em humanos (WANG *et al.*, 2005) e SVS2 em camundongos. Com base em nossos achados, propomos que a interação EPPIN-SVS2 no espermatozoide murino previna sua capacitação prematura ao mesmo tempo em que fornece proteção contra o ataque de patógenos e proteases nas porções iniciais do sistema reprodutor feminino (Figura 19). Além disso, supomos que a SVS3 atua facilitando os efeitos inibitórios do complexo EPPIN-SVS2 (Figura 19). Nossa hipótese é que quando os espermatozoides atingem as regiões uterinas perto do oviduto, uma enzima semelhante à PSA humana degrada a SVS2, desfaz o complexo com EPPIN-SVS2-SVS3 e permite a capacitação espermática e eventos relacionados, como reação acrossômica e fertilização (Figura 19). No camundongo foram identificados 13 genes funcionais e 9 pseudogenes para caliceínas (LUNDWALL, 2013), família a qual pertence a PSA. Curiosamente o gene ortólogos da PSA humana no genoma murino é um pseudogene, reforçando a hipótese de que outra caliceína é responsável pela degradação da SVS2. Todavia, experimentos adicionais são necessários para fornecer suporte a esse modelo de trabalho.

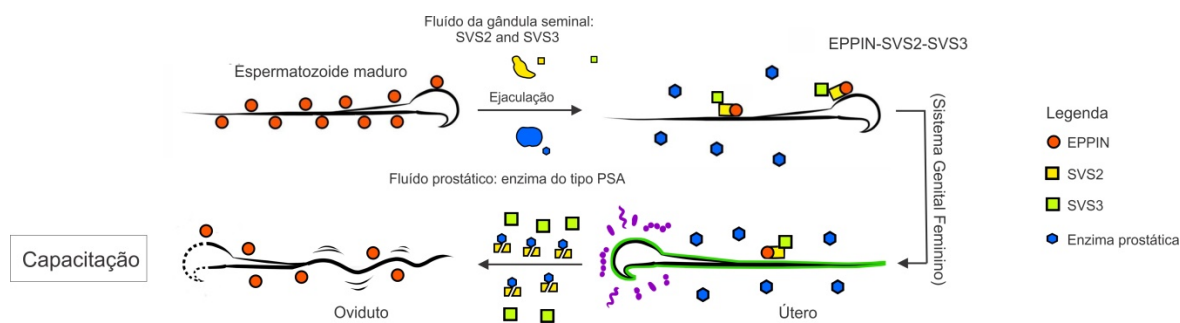


Figura 19: Mecanismo proposto que mostra a potencial relevância fisiológica da interação EPPIN-SVS2 no espermatozoide murino. A EPPIN é encontrada na superfície do espermatozoide maduro. Após a ejaculação, o complexo SVS2-SVS3 é ligado à EPPIN na superfície do espermatozoide levando a formação de um novo complexo proteico que protege os espermatozoides contra patógenos e proteases do útero (espermatozoide protegido em verde) e impede a capacitação precoce. No oviduto, local de fertilização, uma enzima do tipo PSA degrada a SVS2 interrompendo sua interação com a EPPIN e SVS3, facilitando a capacitação espermática e posterior fertilização.

Finalmente, outras potenciais proteínas parceiras da EPPIN identificadas, foram a GADPS e VDAC2, intrínsecos do próprio espermatozoide. O GADPS é uma isoforma enzimática específica do espermatozoide envolvida na via glicolítica, desempenhando papéis essenciais na motilidade espermática (MIKI *et al.*, 2004; WELCH *et al.*, 2006). Camundongos *knockout* são inférteis, em parte, devido a defeitos na motilidade dos espermatozoides (MIKI *et al.*, 2004) e semelhante à EPPIN, atualmente o GAPDS se tornou um alvo farmacológico para a contracepção masculina (SEXTON *et al.*, 2011).

O VDAC2 é um membro da família de canais de ânions dependentes de voltagem, ou porinas mitocondriais que desempenha funções na espermatogênese, maturação do espermatozoide e na fertilização. O VDAC2 foi encontrado na membrana mitocondrial externa e região acrossômica dos espermatozoides de mamíferos, desempenhando papel no influxo de Ca^{2+} necessário para motilidade espermática, capacitação e reação acrossômica (LIU *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-ABAD *et al.*, 2017). Curiosamente, a incubação de espermatozoides humanos com SEMG1 ou anticorpo anti-EPPIN S21C causou diminuição na concentração de Ca^{2+} intracelular através de um mecanismo desconhecido (O'RAND; WIDGREN, 2012). A identificação do VDAC2 como uma potencial proteína

parceira da EPPIN fornece novas interpretações a respeito dos mecanismos que podem estar envolvidos no controle da motilidade do espermatozoide.

Conclusão

6. Conclusão

Nossos achados mostram que a expressão da EPPIN não é restrita ao testículo e epidídimo, mas também está presente no ducto deferente, glândula seminal e glândula adrenal de camundongos machos. Além disso, nosso estudo elucidou as potenciais proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide murino. Proteínas secretadas pela glândula seminal, como a SVS2, emergem como parceiros de interação da EPPIN na superfície do espermatozoide murino, dando lastro à hipótese da conservação funcional da EPPIN humana e murina. Essas interações proteína-proteína na superfície do espermatozoide envolvendo a EPPIN como elemento central indicam a importância dessa proteína para função espermática.

Em conjunto, nossas descobertas abrem novas fronteiras para o estudo das funções que a EPPIN exerce nos novos locais de expressão e suportam o potencial do camundongo como modelo experimental para ensaios pré-clínicos envolvendo a EPPIN e suas proteínas parceiras como alvos farmacológicos para contracepção masculina. A identificação das proteínas de interação da EPPIN no presente estudo pode auxiliar no racional para o desenvolvimento de drogas com propriedades contraceptivas que possam interferir em mecanismos cruciais para a funcionalidade e capacidade de fertilização do gameta masculino.

Referências

7. Referências

- AITKEN, R. J. *et al.* As the world grows: contraception in the 21st century. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1330–1343, 2008.
- AMORY, J. K. Male contraception. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 6, p. 1303–1309, 2016.
- ARAKI, N. *et al.* Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 152, n. 4, p. 313–321, 2016.
- ARIFUZZAMAN, S.; RAHMAN, M. S.; PANG, M.-G. Research update and opportunity of non-hormonal male contraception: Histone demethylase KDM5B-based targeting. *Pharmacological Research*, v. 141, p. 1–20, 2019.
- ATTARDI, B. J.; HILD, S. A.; REEL, J. R. Dimethandrolone undecanoate: a new potent orally active androgen with progestational activity. *Endocrinology*, v. 147, n. 6, p. 3016–3026, 2006.
- BEBB, R. A. *et al.* Combined administration of levonorgestrel and testosterone induces more rapid and effective suppression of spermatogenesis than testosterone alone: a promising male contraceptive approach. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 81, n. 2, p. 757–762, 1996.
- BEHRE, H. M. *et al.* Efficacy and Safety of an Injectable Combination Hormonal Contraceptive for Men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 101, n. 12, p. 4779–4788, 2016.
- BHAT, G. S.; SHASTRY, A. A prospective double-blind, randomized, placebo-controlled study to evaluate the efficacy of silodosin 8 mg as an on-demand, reversible, nonhormonal oral contraceptive for males: a pilot study. *World Journal of Urology*, 2019.
- BOURGEON, F. *et al.* Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 3, p. 768–774, 2004.
- BREHM, R.; STEGER, K. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, v. 181, p. 1–93, 2005.
- BURKS, D. J. *et al.* Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science (New York, N.Y.)*, v. 269, n. 5220, p. 83–86, 1995.
- CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*, v. 97, n. 2, p. 267–274, 2012.
- CARVALHO, P. C. *et al.* PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nature protocols*, v. 11, n. 1, p. 102–117, 2016.
- CHAO, J.; PAGE, S. T.; ANDERSON, R. A. Male contraception. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 28, n. 6, p. 845–857, 2014.
- CLAUSS, A.; LILJA, H.; LUNDWALL, A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 333, n. 2, p. 383–389, 2005.
- DARSZON, A. *et al.* Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, v. 91, n. 4, p. 1305–1355, 2011.

DAVIES, B. *et al.* Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 19, p. 8642–8648, 2004.

DE LAMIRANDE, E. *et al.* Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *Journal of Andrology*, v. 22, n. 4, p. 672–679, 2001.

DEMARCO, I. A. *et al.* Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 9, p. 7001–7009, 2003.

DREVET, J. R. Epididymal approaches to male contraception. *Basic and Clinical Andrology*, v. 28, 2018.

FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, v. 13, n. 2, p. 397–406, 2014.

GALDIERO, F. *et al.* Inhibition of macrophage phagocytic activity by SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 16, n. 3, p. 269–284, 1989.

GIPSON, J. D.; KOENIG, M. A.; HINDIN, M. J. The effects of unintended pregnancy on infant, child, and parental health: a review of the literature. *Studies in Family Planning*, v. 39, n. 1, p. 18–38, 2008.

GU, Y. *et al.* Multicenter contraceptive efficacy trial of injectable testosterone undecanoate in Chinese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 94, n. 6, p. 1910–1915, 2009.

GU, Y.-Q. *et al.* A multicenter contraceptive efficacy study of injectable testosterone undecanoate in healthy Chinese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 88, n. 2, p. 562–568, 2003.

HARDEE, K. *et al.* Unintended pregnancy and women's psychological well-being in Indonesia. *Journal of Biosocial Science*, v. 36, n. 5, p. 617–626, 2004.

IRWIN, J. J. *et al.* Automated docking screens: a feasibility study. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 18, p. 5712–5720, 2009.

JIMENEZ, T. *et al.* Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 2, p. 644–649, 2011.

KAWANO, N. *et al.* Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 11, p. 4145–4150, 2014.

KAWANO, N.; YOSHIDA, M. Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biology of Reproduction*, v. 76, n. 3, p. 353–361, 2007.

KLENTZERIS, L. D. *et al.* A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 10, n. 3, p. 728–733, 1995.

KOPF, G. S. Approaches to the identification of new nonhormonal targets for male contraception. *Contraception*, v. 78, n. 4 Suppl, p. S18-22, 2008.

LIU, B. *et al.* The use of anti-VDAC2 antibody for the combined assessment of human sperm acrosome integrity and ionophore A23187-induced acrosome reaction. *PloS One*, v. 6, n. 2, p. e16985, 2011.

LOGAN, C. *et al.* *The consequences of unintended childbearing: A white paper*. [S.l.: s.n.], 2007.

LUNDWALL, A. Old genes and new genes: the evolution of the kallikrein locus. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 110, n. 3, p. 469–475, 2013.

MANGELS, R. *et al.* Genetic and phenotypic influences on copulatory plug survival in mice. *Heredity*, v. 115, n. 6, p. 496–502, 2015.

MANNOWETZ, N.; MILLER, M. R.; LISHKO, P. V. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 22, p. 5743–5748, 2017.

MARTIN, C. W. *et al.* Potential impact of hormonal male contraception: cross-cultural implications for development of novel preparations. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 15, n. 3, p. 637–645, 2000.

MARTÍNEZ-ABAD, S. *et al.* Voltage-dependent anion channel 2 is involved in in vitro capacitation of boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52 Suppl 4, p. 65–68, 2017.

MATSUDA, A. *et al.* Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 38, p. 36350–36357, 2003.

MATZUK, M. M.; LAMB, D. J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, v. 14, n. 11, p. 1197–1213, 2008.

MCCRUDDEN, M. T. C. *et al.* Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. *The FEBS journal*, v. 275, n. 8, p. 1742–1750, 2008.

MELÉ, M. *et al.* Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science (New York, N.Y.)*, v. 348, n. 6235, p. 660–665, 2015.

METZ, C. B. Chapter 5 Sperm and Egg Receptors Involved in Fertilization. In: MOSCONA, A. A.; MONROY, A. *Current Topics in Developmental Biology*. [S.l.]: Academic Press, 1978. v. 12. p. 107–147.

MIKI, K. *et al.* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 47, p. 16501–16506, 2004.

MITRA, A.; RICHARDSON, R. T.; O'RAND, M. G. Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biology of Reproduction*, v. 82, n. 3, p. 489–496, 2010.

MOMMERS, E. *et al.* Male hormonal contraception: a double-blind, placebo-controlled study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 93, n. 7, p. 2572–2580, 2008.

O'RAND, M. G. *et al.* Epididymal protein targets: a brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. *Journal of Andrology*, v. 32, n. 6, p. 698–704, 2011.

O'RAND, M. G. *et al.* Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: effect on cyclic adenosine monophosphate. *Biology of Reproduction*, v. 80, n. 2, p. 279–285, 2009.

O'RAND, M. G. *et al.* Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS One*, v. 13, n. 4, p. e0195953, 2018.

O'RAND, M. G. *et al.* Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin. *Science (New York, N.Y.)*, v. 306, n. 5699, p. 1189–1190, 2004.

O'RAND, M. G.; SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G. Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 157, p. 105–111, 2016.

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E. Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 2, p. 55, 2012.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction*, v. 41, n. 4, p. 683–699, 1989.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PIOTROWSKA, K. *et al.* Male hormonal contraception: hope and promise. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, v. 5, n. 3, p. 214–223, 2017.

RATNASOORIYA, W. D.; GILMORE, D. P.; WADSWORTH, R. M. Effect of local application of sympathomimetic drugs to the epididymis on fertility in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 58, n. 1, p. 19–25, 1980.

RATNASOORIYA, W. D.; WADSWORTH, R. M. Impairment of fertility of male rats with prazosin. *Contraception*, v. 41, n. 4, p. 441–447, 1990.

RATNASOORIYA, W. D.; WADSWORTH, R. M. Tamsulosin, a selective alpha 1-adrenoceptor antagonist, inhibits fertility of male rats. *Andrologia*, v. 26, n. 2, p. 107–110, 1994.

REDDY, K. V.; MEHERJI, P. K.; SHAHANI, S. K. Integrin cell adhesion molecules on human spermatozoa. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 36, n. 5, p. 456–463, 1998.

REN, D. Sperm and the proton channel. *The New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 20, p. 1934–1935, 2010.

RIBEIRO, C. M. *et al.* Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the β -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 404, p. 141–150, 2015.

RICHARDSON, R. T. *et al.* Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene*, v. 270, n. 1–2, p. 93–102, 2001.

ROBAIRE B, HINTON BT. The Epididymis. In: Plant TM, Zeleznik AJ (eds.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition). San Diego: Academic Press, 691-771, 2015.

ROBERT, M.; GAGNON, C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: association with semen coagulum. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 10, n. 8, p. 2192–2197, 1995.

ROBERTS, K. P. *et al.* Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 250, n. 1–2, p. 122–127, 2006.

ROOSEN-RUNGE, E. C. *The Process of Spermatogenesis in Animals*. 1 edition ed. London ; New York: Cambridge University Press, 1977.

ROTH, M. Y.; AMORY, J. K. Beyond the Condom: Frontiers in Male Contraception. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 34, n. 3, p. 183–190, 2016.

RUEDEN, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, v. 18, 2017.

SCOTT, A. *et al.* Characterisation of eppin function: expression and activity in the lung. *The European Respiratory Journal*, v. 50, n. 1, 2017.

SEDGH, G.; SINGH, S.; HUSSAIN, R. Intended and unintended pregnancies worldwide in 2012 and recent trends. *Studies in Family Planning*, v. 45, n. 3, p. 301–314, 2014.

SEXTON, J. Z. *et al.* Development and Implementation of a High Throughput Screen for the Human Sperm-Specific Isoform of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDHS). *Current Chemical Genomics*, v. 5, p. 30–41, 2011.

SILVA, E. J. R. *et al.* Characterization of EPPIN's Semenogelin I Binding Site: A Contraceptive Drug Target. *Biology of Reproduction*, v. 87, n. 3, 2012.

SILVA, E. J. R. *et al.* Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 79, n. 12, p. 832–842, 2012.

SILVA, E. J. R. *et al.* Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 325, n. 1–2, p. 64–77, 2010.

SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G.; O'RAND, M. G. Interacting proteins on human spermatozoa: adaptive evolution of the binding of semenogelin I to EPPIN. *PloS One*, v. 8, n. 12, p. e82014, 2013.

SIPILÄ, P.; BJÖRKGREN, I. Segment-specific regulation of epididymal gene expression. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 152, n. 3, p. R91-99, 2016.

SIVASHANMUGAM, P. *et al.* Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. *Gene*, v. 312, p. 125–134, 2003.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. Database issue, p. D362–D368, 2017.

THIRUMALAI, A. *et al.* Effects of 28 Days of Oral Dimethandrolone Undecanoate in Healthy Men: A Prototype Male Pill. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 104, n. 2, p. 423–432, 2019.

TOSHIMORI, K.; EDDY, E. M. *The Spermatozoon*. In: Plant TM, Zeleznik AJ (eds.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition). San Diego: Academic Press, 691–771, 2015.

TSUI, A. O.; MCDONALD-MOSLEY, R.; BURKE, A. E. Family Planning and the Burden of Unintended Pregnancies. *Epidemiologic Reviews*, v. 32, n. 1, p. 152–174, 2010.

TURNER, L. *et al.* Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 88, n. 10, p. 4659–4667, 2003.

UHLÉN, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, v. 347, n. 6220, p. 1260419, 2015.

UNITED NATIONS. *United Nations. The Millennium Development Goals report 2006*. DESA, 2006. Disponível em: <<https://www.un.org/zh/millenniumgoals/pdf/MDGReport2006.pdf>>.

VAN DER SPOEL, A. C. *et al.* Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: a nonhormonal approach to male contraception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 26, p. 17173–17178, 2002.

WANG, J.-Y. *et al.* Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, v. 78, n. 4, p. 249–257, 2015.

WANG, Z. *et al.* Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 72, n. 5, p. 1064–1070, 2005.

WANG, Z. *et al.* Eppin: a molecular strategy for male contraception. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 65, p. 535–542, 2007.

WELCH, J. E. *et al.* Expression of the spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDS) in rat testis. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 8, p. 1052–1060, 2006.

WHO, W. *Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men*. World Health Organization Task Force on methods for the regulation of male fertility, 1990.

WHO, W. *Unsafe abortion: global and regional estimates of the incidence of unsafe abortion and associated mortality in 2008*, 2011.

WILLEMS, A. *et al.* Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular gene expression. *International journal of andrology*, v. 33, n. 3, p. 507–517, 2010.

WU, Y.; LI, Q.; CHEN, X.-Z. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nature Protocols*, v. 2, n. 12, p. 3278–3284, 2007.

YENUGU, S. *et al.* Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 5, p. 1484–1490, 2004.

YILDIZ, Y. *et al.* Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 11, p. 2985–2994, 2006.

YOO, M. *et al.* DSigDB: drug signatures database for gene set analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 31, n. 18, p. 3069–3071, 2015.

YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; YOSHIDA, K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 65, n. 21, p. 3446–3457, 2008.

YOUNG, J. Y. *et al.* Worldwide Protein Data Bank biocuration supporting open access to high-quality 3D structural biology data. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, v. 2018, 2018.

ZHANG, G. Y. *et al.* A clinical trial of injectable testosterone undecanoate as a potential male contraceptive in normal Chinese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 84, n. 10, p. 3642–3647, 1999.

ZHANG, H. *et al.* (S)- α -chlorohydrin inhibits protein tyrosine phosphorylation through blocking cyclic AMP - protein kinase A pathway in spermatozoa. *PloS One*, v. 7, n. 8, p. e43004, 2012.

ZHANG, J. *et al.* The effect of anti-eppin antibodies on ionophore A23187-induced calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)*, v. 25, n. 1, p. 29–36, 2010.

Materials suplementares

8. Material Suplementar

Materiais suplementares para:

**Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos:
identificação, expressão e potenciais papéis fisiológicos**

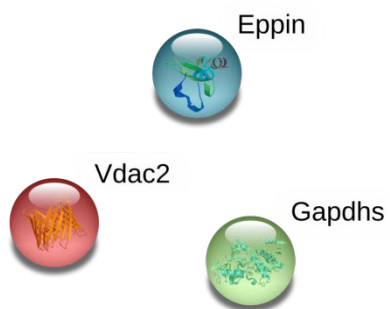


Figura suplementar S1. Rede de interação entre as potenciais proteínas de interação da EPPIN provenientes do próprio espermatozoide. EPPIN: inibidor da protease do epidídimo; GADPHS: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase; VDACC2: Proteína 2 do canal seletivo de ânions dependente de voltagem. A rede de interação foi construída usando a plataforma "STRING: redes de associação de proteínas funcionais".

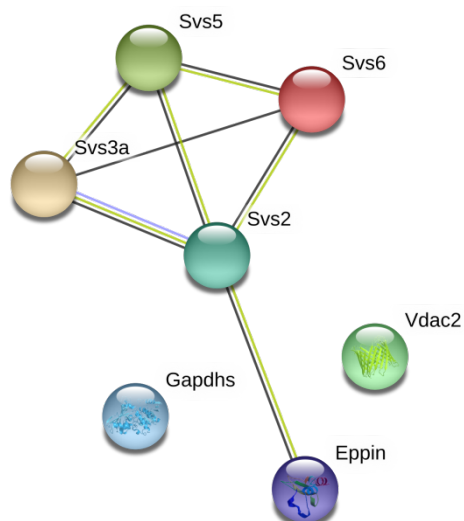


Figura suplementar S2. Rede de interação entre as potenciais proteínas de interação da EPPIN provenientes do próprio espermatozoide e fluido da glândula seminal. EPPIN: inibidor da protease do epidídimo; GAPDHS: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase; VDAC2: Proteína 2 do canal seletivo de ânions dependente de voltagem; Acr: Acrosina. Svs2: Proteína secretada pela glândula seminal 2; SVS3a: Proteína secretada da glândula seminal 3 isoforma a; Svs5: Proteína secretada pela glândula seminal 5 e Svs6: Proteína secretada pela glândula seminal 6. A rede de interação foi construída usando a plataforma "STRING: redes de associação de proteínas funcionais".

Tabela S1: Proteínas identificadas em espermatozoides incubados com fluido de glândula seminal de camundongos após co-immunoprecipitação com anticorpo anti-EPPIN Q20E e espectrometria de massas

Proteína	Sigla	Código de acesso no NCBI	Grupo	Subgrupo	Cobertura	Score	Contagem de sequências	NSAF	Experimento
Acrosina	Acr	NP_001264175		Reação	0,025	3,58	1	0,00001	1
				Acrossômica	0,025	3,86	1	0,00001	2
Proteína âncora de quinase 4 isoforma A	Akap4	NP_033781			0,210	99,12	20	0,0001	1
Proteína de fibra densa externa 2 isoforma A	Odf2	NP_001171132			0,01	2,07	1	0,00002	3
					0,191	69,41	15	0,0001	1
Anidrase carbônica 2	Car2	NP_033931		Motilidade espermática	0,02	6,62	3	0,0018	3
					0,039	4,07	1	0,00001	1
Proteína rica em cisteína associada à mitocôndria do espermatozoide	Smcp	NP_032600			0,073	6,01	2	0,00003	2
					0,049	2,68	1	0,00003	1
					0,035	9,62	2	0,00003	3
					0,019	3,43	1	0,00000009	1
					0,085	30,13	5	0,00007	2
Proteína de ligação à acrosina isoforma 1	Acrbp	NP_058541		Reação acrossômica	0,025	3,86	1	0,00001	2
					0,492	69,76	7	0,0004	2
					0,22	4,79	2	0,0003	3
					0,525	55,36	6	0,0006	2
					0,08	1,60	1	0,0002	3
Proteína secretada pela glândula seminal 1	Svs1	NP_766476		Formação do plugue	0,207	84,14	17	0,0001	1
Transglutaminase 4	Tgm4	NP_808579		copulatório	0,020	9,28	2	0,00001	2
					0,100	29,33	7	0,0005	1
					0,019	4,60	1	0,000007	2
Proteína 4 expressa no testículo e próstata	Pate4	NP_064660	Função reprodutiva	Formação do plugue	0,253	5,82	2	0,0001	1
				copulatório; motilidade espermática	0,424	18,95	4	0,0003	2
					0,6	201,8	26	0,0007	2
					0,301	37,09	14	0,0008	3
					0,169	24,49	6	0,0001	2
					0,184	14,36	3	0,0001	1
Antígeno da glândula seminal	Sva	NP_033325		Regulação negativa da capacitação	0,221	35,12	5	0,0003	2
					0,101	12,40	4	0,00006	2
					0,061	2,95	2	0,0001	3
Domínio do núcleo de quatro dissulfureto WAP 15	Wfdc1 5b	NP_001039019		Proteção contra bactérias	0,125	2,77	1	0,00006	1
					0,125	2,86	1	0,00006	2
Proteína secretada pela glândula seminal 4	Svs4	NP_033326	Função imunológica	Indução da resposta imunológica	0,036	9,62	1	0,00003	2
					0,681	69,35	10	0,0009	1
					0,66	42,27	8	0,0005	2
Fosfatidilinositol fosfatase	Ptprq	NP_001074901	Sinalização celular	Desfosforilação de fosfatidilinositol	0,003	14,01	1	0,00001	1
					0,003	13,63	1	0,00001	2
					0,003	10,12	1	0,0011	3

Anexos

Título do Projeto: Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos: identificação, expressão e potenciais papéis fisiológicos;

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

ANEXO I



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado “Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos: identificação, expressão e potenciais papéis fisiológicos”, Protocolo nº 1049-CEUA, sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 09/10/2017	Término: 31/8/2019
Espécie/linhagem:	Camundongo C57BL6	
Nº de animais:	20	
Peso:	25-50g	Idade: 90 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular – INFAR – Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP – CNPJ: 60.453.032/0001-74.	

Botucatu, 18 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



ANEXO II



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

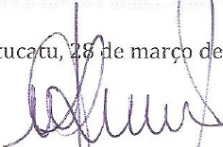


Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da EPPIN (Inibidor de protease epididimário) como macromolécula-alvo para contracepção masculina: desenvolvimento de um modelo animal para avaliar a eficácia de fármacos contraceptivos masculinos.", Protocolo nº 703-CEUA, sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 01/08/2015	Término: 31/1/2020
Espécie/linhagem:	<i>Camundongo C57BL/6J</i>	
Nº de animais:	180	
Peso:	15-50g	Idade: 21 a 90 dias
Sexo:	<i>Macho (165) fêmea (15)</i>	
Origem	<i>Laboratório de Experimentação Animal do Instituto Nacional de Farmacologia (LEA-INFAR), Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina</i>	

Botucatu, 28 de março de 2016.


Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA



ANEXO III



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 13 de maio de 2016
CEUA N 9776170216

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Erick José Ramo Da Silva
Depto/Disc: Farmacologia
Pesquisadores associados: Maria Christina Werneck De Avellar (universidade Federal De São Paulo - Escola Paulista De Medicina);

Título do projeto: "Estudo da EPPIN como macromolécula-alvo para contracepção masculina: desenvolvimento de um modelo animal para avaliar a eficácia de fármacos contraceptivos masculinos."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

Em escala mundial, quase metade das gestações não são planejadas pelos casais, causando a morte de 80 mil mulheres anualmente devido a complicações por abortos. É reconhecido que a entrada de novos métodos contraceptivos masculinos no mercado facilitará o planejamento familiar, auxiliando na redução desses números e na promoção da saúde da família. O gene EPPIN (Epididymal protease inhibitor) é um alvo promissor para a contracepção masculina devido ao seu papel crítico na fertilidade. Em humanos, a EPPIN está presente na superfície dos espermatozoides, onde tem papel na motilidade espermática. Estudos in vitro demonstraram que anticorpos anti-EPPIN reduziram a motilidade do espermatozoide humano, indicando que é possível inibir a função espermática pela manipulação farmacológica dessa proteína. O avanço no desenvolvimento da EPPIN como alvo de fármacos contraceptivos depende da compreensão dos mecanismos pelos quais esta modula a motilidade espermática in vivo. Nesse sentido, o objetivo deste projeto é investigar o papel do gene Eppin na fertilidade masculina utilizando camundongos como modelo experimental. Realizaremos ensaios funcionais, moleculares e de interação proteína-proteína visando avançar no entendimento do papel da EPPIN na reprodução e no seu potencial como alvo terapêutico para contracepção masculina.

ANIMAIS - Serão utilizados:

35 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Machos, Peso: 10 g, idade: 21 dias
35 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Machos, Peso: 20 g, idade: 40 dias
15 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Machos, Peso: 30 g, idade: 60 dias
30 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Machos, Peso: 40 g, idade: 90 dias
15 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Fêmeas, Peso: 35g, idade: 90 dias

Procedência: Laboratório de Experimentação Animal do INFAR (LEA-INFAR)
Manutenção: Laboratório de Experimentação Animal do INFAR (LEA-INFAR)

50 Camundongos isogênico C57BL/6J, Gênero: Machos, Peso: 40 g, idade: 90 dias

Procedência: Laboratório de Experimentação Animal do INFAR (LEA-INFAR)
Manutenção: Biotério do departamento de farmacologia do IBB/UNESP

VIGÊNCIA DO ESTUDO:

Início previsto para: 04/2016 com término previsto para: 01/2021

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 11/04/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

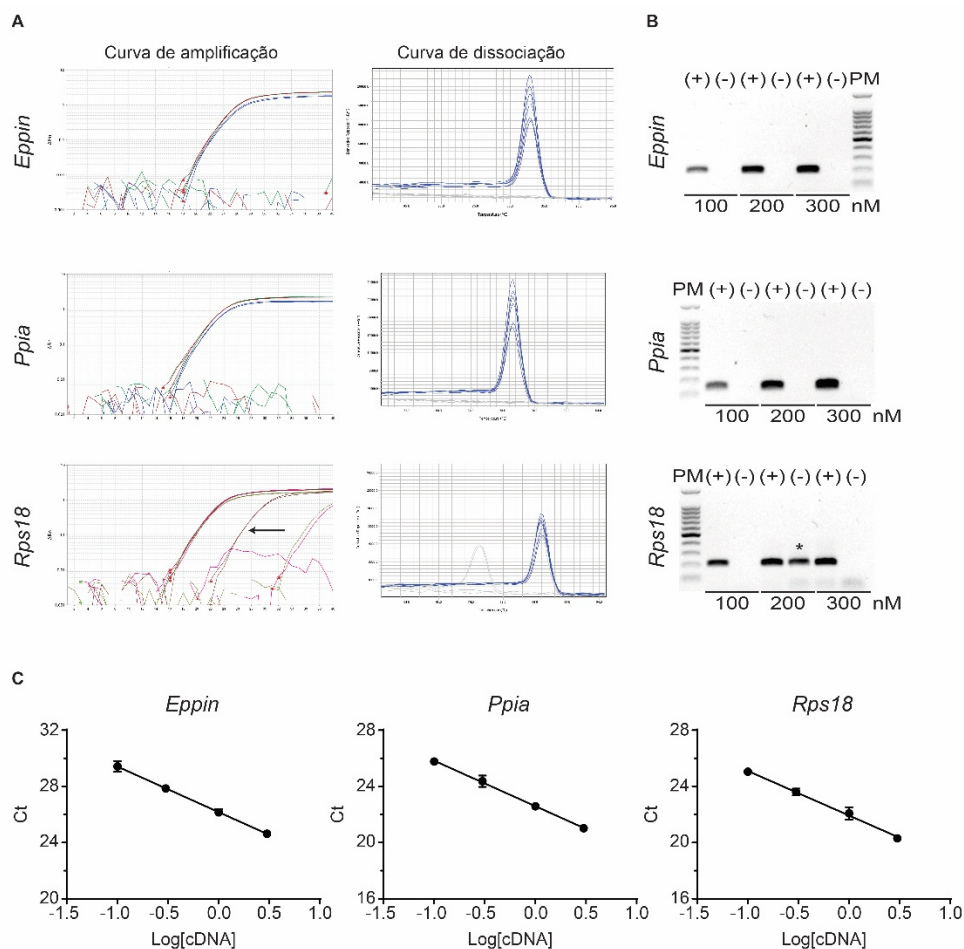


4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

ANEXO IV



Anexo 4. Padronização dos ensaios de RT-qPCR para detecção dos transcritos *Eppin*, *Ppia* e *Rps18* em amostras de RNA total de órgãos de camundongos. Os experimentos foram realizados na presença (+) ou ausência (-) de amostras de cDNA de segmento inicial de camundongos adultos em duplicata. **(A)** Curvas de amplificação e de dissociação dos transcritos citados anteriormente na presença de 100, 200 e 200 nM de oligonucleotídeos iniciador. A seta na curva de amplificação do transcrito *Rps18* em 200 nM de primer indica contaminação. **(B)** Gel de agarose contendo as reações de qPCR em (A). * indica a contaminação da amostra (-) para a amplificação do transcrito *Rps18* em 200 nM de primer. PM indica marcador de DNA de 100 pares de base. **(C)** Curva de eficiência de amplificação dos transcritos *Eppin*, *Ppia* e *Rps18* a partir de curva de padrão de cDNA em triplicata. Os valores da inclinação da reta (\pm erro padrão) são $-3,241 \pm 0,0134$; $-3,174 \pm 0,124$; e $-3,238 \pm 0,066$ para *Eppin*, *Ppia* e *Rps18*, respectivamente.

