



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Clara Ferrari Themer

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E
DISTRIBUIÇÃO CELULAR DA EPPIN (*EPIDIDYMAL
PROTEASE INHIBITOR*) NO ESPERMATOZOIDE HUMANO:
UM ALVO PARA CONTRACEPÇÃO
MASCULINA.**

Trabalho de Conclusão de
Curso de Graduação em
Enfermagem, realizado na
Faculdade de Medicina da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, como
requisito para obtenção do
título de Enfermeira.

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

**Botucatu
2023**

Ana Clara Ferrari Themer

Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular
da EPPIN (*Epididymal Protease Inhibitor*) no
espermatozoide humano: um alvo para contracepção
masculina.

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Enfermagem,
realizado na Faculdade de Medicina
de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", como requisito para obtenção
do Título de Enfermeira.

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Themer, Ana Clara Ferrari.

Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN (*Epididymal Protease Inhibitor*) no espermatozoide humano : um alvo para contracepção masculina / Ana Clara Ferrari Themer. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Enfermagem)
- Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Erick José Ramo da Silva

Capes: 40400000

1. Anticoncepção masculina. 2. Interação
proteína-proteína. 3. Planejamento familiar.

Palavras-chave: Contracepção masculina; Interação
proteína-proteína; Planejamento familiar.

Ana Clara Ferrari Themer

Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular da
EPPIN (*Epididymal Protease Inhibitor*) no espermatozoide
humano: um alvo para contracepção
masculina.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de

Botucatu, para obtenção do título de enfermeira

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Comissão examinadora:

Prof. Dr Erick José Ramo da Silva Universidade
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof(a). Dr(a) Silvana Andrea Molina Lima
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof(a). Dr(a) Marli Teresinha Cassamassimo Duarte
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 26 de Novembro de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade por estar comigo em todos os momentos.

A minha família que me deu suporte e me apoiou durante toda a graduação.

A minha mãe, que encorajou o meu desejo desde adolescente a estudar na Unesp e mesmo internada no paliativo ficava do meu lado me vendo estudar e falava palavras de apoio.

Ao meu namorado que compartilhou essa caminhada comigo, me acalmou nos momentos estressantes, esteve presente em momentos importantes da minha vida e sempre me apoiando em minhas escolhas.

A minhas amigas que estiveram comigo durante todo esse processo.

Agradeço ao professor Erick pela oportunidade de adentrar no laboratório e na pesquisa, graças a ele tive meu sonho de criança de ser pesquisadora realizado e sou muito grata a ele por ter me orientado durante os anos de graduação e por ter acreditado em mim!

A Noemia que me coorientou nos meus projetos de pesquisa. Sou grata por todos os ensinamentos, apoio, risadas, companheirismo e críticas construtivas. Tenho você e o professor Erick como exemplos.

A Natália que esse ano teve grandes desafios do doutorado e me ajudou em todos os momentos que precisei. Muito obrigada por tudo!

Ao Hélio por toda paciência, treinamento, ensinamento, convivência e por me ajudar nos meus experimentos durante minhas iniciações científicas. Muito obrigada!

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia, que contribuíram para a minha formação. Em especial ao Dr. Célio, por ter contribuindo no desenvolvimento na pesquisa.

A professora Dra Ana Gabriela Pontes e Dra Gisela Daroz, pela parceria e colaboração fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa e obtenção de nossos resultados.

Ao professor Dr. Rafael Henrique Nobrega por permitirem o uso dos microscópios para as análises dos experimentos de imunofluorescência.

RESUMO

A gravidez não planejada constitui um grande problema de saúde global, sendo a estatística mundial cerca de 40%. Esse dado reflete a necessidade de ampliação dos métodos de contracepção, principalmente para o público masculino, visto estarem disponíveis somente dois métodos: vasectomia e preservativo. Nesse sentido, a proteína espermática EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*) é um alvo farmacológico promissor para a contracepção masculina não-hormonal devido ao seu papel fundamental no controle da motilidade espermática após a ejaculação. A EPPIN é expressa no testículo e epidídimo, e está presente na superfície dos espermatozoides humanos, onde atua inibindo a motilidade espermática via interação com a proteína seminal SEMG1 (semenogelina-1) após a ejaculação. Ligantes da EPPIN, como anticorpos anti-EPPIN e moléculas orgânicas de baixo peso molecular, possuem efeitos inibitórios sobre a motilidade do espermatozoide humano. Apesar desses avanços, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a EPPIN modula a motilidade espermática; além disso, sua distribuição celular no espermatozoide humano ejaculado é pouco caracterizada. Assim, esta pesquisa teve como objetivo investigar a expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano e sua colocalização com a SEMG1. Para isso, utilizamos amostras de espermatozoides humanos, coletados de 3 voluntários, segundo critérios de normalidade da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Aprovação CEP-FMB/UNESP: 64342822.9.0000.5411) e realizamos ensaios de *Western blot* e imunofluorescência, utilizando os anticorpos anti-EPPIN Q20E e S21C, que reconhecem epítomos nas regiões N- e C-terminal da proteína, respectivamente e o anticorpo anti-SEMG1 S20H. Nossos resultados mostraram maior abundância da EPPIN nas regiões: anel posterior (99,5%), dispersa (51%) e pós-acrossômica (42%), da cabeça, além de marcação em todas as regiões do flagelo: peça de conexão (99,5%), peça intermediária (99,5%) e peça principal (69,3%). Adicionalmente, observamos maior abundância da colocalização entre a EPPIN e SEMG1 nas regiões pós-acrossômica e anel posterior da cabeça e todas as regiões do flagelo. Nossos resultados aumentam o conjunto de informações sobre a localização da EPPIN no espermatozoide humano, bem como sugerem funções adicionais para a EPPIN via interação com a SEMG1 no gameta masculino, além da regulação da motilidade espermática.

Palavras-chave: Interação proteína-proteína. Contracepção masculina. Planejamento familiar

ABSTRACT

Unplanned pregnancy is a major global health problem, reaching almost half of pregnancies worldwide. This scenario reflects the need to expand contraceptive methods, especially for men since only two male methods are available: vasectomy and condoms. In this sense, the sperm-associated protein EPPIN (Epididymal protease inhibitor) is a promising pharmacological target for non-hormonal male contraception due to its fundamental role in controlling sperm motility after ejaculation. EPPIN is expressed in the testis and epididymis, and is present on the surface of human spermatozoa, where it inhibits sperm motility after ejaculation via interaction with the seminal plasma protein SEMG1 (semenogelin-1). EPPIN ligands, such as anti-EPPIN antibodies and low molecular weight organic molecules, have inhibitory effects on human sperm motility. Despite these advances, a basic aspect of EPPIN biology, namely its cellular distribution in ejaculated human spermatozoa is poorly characterized. Thus, this research aimed to investigate the expression and cellular distribution of EPPIN in human spermatozoa and its colocalization with SEMG1. For that, we used human sperm samples collected from 3 volunteers, according to the normality criteria of the World Health Organization (WHO) (CEP-FMB/UNESP Approval: 64342822.9.0000.5411). The samples were processed for Western blot and immunofluorescence assays, using the anti-EPPIN S21C and Q20E antibodies, which recognize epitopes in EPPIN's C-terminus and N-terminus, respectively, and the anti-SEMG1 S20H antibody. Our results showed an intense EPPIN-positive immunostaining in the posterior ring (99.5%), dispersed (51%) and post-acrosomal (42%), of the head, in addition to marking in all regions of the flagellum: connection piece (99.5%), intermediate piece (99.5%) and main piece (69.3%). Moreover, we observed EPPIN and SEMG1 colocalization in the post-acrosomal region and posterior ring of the sperm head and all regions of the flagellum. Our results increase the body of information on the localization of EPPIN in human spermatozoa, as well as suggest novel insights about its functions via interaction with SEMG1, beyond the regulation of sperm motility.

Keywords: Protein-protein interaction. Male contraception. Family planning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração esquemática do gene <i>EPPIN</i> e seu produto proteico.....	04
Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental do projeto.....	06
Figura 3. Representação esquemática da segmentação do espermatozoide humano.....	10
Figura 4. Detecção da EPPIN em extratos proteicos totais espermatozoides humanos por ensaio de <i>Western blot</i> utilizando o anticorpo anti-EPPIN S21C.....	11
Figura 5. Imunolocalização da EPPIN nos diferentes segmentos de marcações em espermatozoides humanos ejaculados.....	13
Figura 6. Colocalização EPPIN/SEMG-1 nos diferentes segmentos de marcações em espermatozoides humanos ejaculados.....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre os anticorpos primários utilizados nos ensaios de <i>Western blot</i> e imunofluorescência.....	08
Tabela 2 - Informações sobre os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de <i>Western blot</i> e imunofluorescência.....	08
Tabela 3 - Frequência de imunomarcção da EPPIN em regiões da cabeça e flagelo do espermatozoide utilizando os anticorpos anti-EPPIN Q20E e S21C.....	12

LISTA DE ABREVIATURAS

WFDC	Whey-acidic protein- type four disulfide core domain) [C-x-/C/- [DN]- x(2)-C-x(S)-C-C]
EPPIN	<i>Epididymal protease inhibitor</i>
SEMG1	Semenogelina-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
LTF	Lactotransferrina
CLU	Clusterina
EPC	<i>Eppin Protein Complex</i>

SUMÁRIO

1.Introdução.....	01
2.Objetivos.....	06
2.1. Objetivo geral	06
2.2. Objetivos específicos.....	06
3. Metodologia.....	06
3.1 Delineamento experimental.....	06
3.2. Materiais e Métodos.....	07
3.2.1. Amostras Biológicas e aspectos éticos.....	07
3.2.2. Anticorpos.....	07
3.2.3. Ensaaios de Western blot.....	09
3.2.4. Ensaaios de imunofluorescência.....	09
4. Resultados e Discussão.....	10
4.1 Caracterização da distribuição celular da proteína espermática	10
<i>EPPIN no espermatozoide humano.....</i>	
4.2 Colocalização da EPPIN e SEMG-1 no espermatozoide	15
humano.....	
5. Conclusão.....	18
6. Referências.....	18
Anexo 1.....	I
Anexo 2.....	II
Anexo 3.....	IV
Anexo 4.....	IX

1. INTRODUÇÃO

Métodos contraceptivos podem inibir de forma reversível a fertilidade, evitando a gravidez indesejada. Esses métodos são essenciais dentro do escopo de ações para o controle da natalidade e planejamento familiar . Atualmente, diversos contraceptivos estão disponíveis no mercado; sendo os métodos farmacológicos hormonais os mais utilizados (Teal & Edelman, 2021). Nesse contexto, vale ressaltar que a maioria dos métodos farmacológicos ou não-farmacológicos para contracepção são de uso feminino, o que torna a mulher a principal carreadora das responsabilidades e riscos associados ao seu uso. Mudanças nesse cenário demandam o aumento das opções de métodos masculinos para o controle de natalidade, trazendo maior igualdade de gênero das tarefas associadas ao planejamento familiar.

De fato, apenas dois métodos de contracepção estão disponíveis para o público masculino, o preservativo e a vasectomia. Ambos os métodos apresentam fatores que dificultam sua aplicação no cotidiano: a camisinha apresenta alto índice de falha na segurança da contracepção, e a vasectomia é um método invasivo e de baixa adesão de escolha entre adolescentes, adultos jovens e indivíduos sem filhos, devido sua baixa reversibilidade (Marchi *et al.*, 2011; Amory, 2016). A partir desse cenário, observa-se a necessidade de adquirir novas estratégias farmacológicas reversíveis para a contracepção masculina, o que trará maior balanço na divisão dos riscos e responsabilidades entre mulheres e homens na contracepção e planejamento familiar.

Diversas estratégias para contracepção masculina encontram-se em fases de desenvolvimento clínico ou pré-clínico (Long *et al.*, 2019; Kent *et al.*, 2020). Os métodos hormonais visam a inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal via administração de androgênios em combinação com progestinas, ocasionando inibição reversível da esteroidogênese testicular e da espermatogênese (Piotrowska *et al.*, 2017). No entanto, variações na resposta ao tratamento entre populações, limitações associadas à via de administração, longa latência terapêutica (3 a 4 meses) e efeitos adversos (p. ex., ganho de peso, aumento do hematócrito, dislipidemias, acne e alterações da libido) têm dificultado avanços no desenvolvimento clínico desses medicamentos e sua chegada ao mercado farmacêutico (Thirumalai & Amory, 2021).

Nesse sentido, estratégias farmacológicas para contracepção masculina que não envolvem manipulações hormonais têm sido exploradas como alternativa para

suplantar as limitações observadas com os métodos hormonais. As abordagens não-hormonais têm como foco a inibição da espermatogênese ou da função do espermatozoide, pelo bloqueio de eventos fundamentais para sua capacidade de reconhecer e fertilizar o oócito, incluindo motilidade, capacitação, hiperativação e reação acrossômica (O'Rand *et al.*, 2016; Mariani *et al.*, 2023). Nesse contexto, o espermatozoide emerge como uma fonte relevante de alvos farmacológicos promissores para contraceptivos masculinos de uso por demanda, com efeito rápido e seguro (Kopf, 2008; Mariani *et al.*, 2023).

O espermatozoide é uma célula altamente diferenciada que apresenta, em sua estrutura, duas principais regiões: a cabeça e o flagelo, unidos pela peça de conexão. A cabeça é composta pelo núcleo e o acrossoma sendo subdividida em região acrossomal (anterior), segmento equatorial e pós-acrossomal (posterior), e anel posterior. Já o flagelo do espermatozoide é subdividido em quatro principais regiões: peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça final. Além disso, o flagelo apresenta 4 estruturas essenciais para sua função: axonema, bainha mitocondrial, feixe de fibras densas e bainha fibrosa. O axonema é composto por um complexo de “9+1” pares de microtúbulos que se estende por todo o flagelo (Eddy, 2006). A bainha mitocondrial está presente apenas na peça intermediária, circundando o feixe de fibras densas, enquanto que a bainha fibrosa é encontrada apenas na peça principal (Eddy, 2006).

Ao deixarem os testículos, os espermatozoides são células morfologicamente diferenciadas, porém funcionalmente imaturas, sendo incapazes de adquirir motilidade progressiva, hiperativação e fertilizar o oócito. Estas habilidades são adquiridas em duas etapas de maturação espermática pós-testicular. A primeira ocorre no epidídimo (maturação espermática) e a segunda, no sistema genital feminino (capacitação) (Gervasi & Visconti, 2017). A maturação espermática e a capacitação são eventos sequenciais, essenciais para a reprodução e altamente regulados por proteínas espermáticas e pelos fluidos que banham os gametas masculinos durante sua jornada pelo epidídimo e sistema genital feminino (Avellar & Hinton, 2019). Alterações tanto na maturação quanto capacitação espermática são causas reconhecidas de infertilidade masculina.

Nesse contexto, o estudo da maturação e capacitação espermática vem promovendo descobertas relevantes tanto para a identificação de alvos que podem ser inibidos farmacologicamente visando a contracepção quanto para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da

infertilidade masculina (Mariani *et al.*, 2023). Dentre esses alvos, destacamos a proteína espermática EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*), devido ao seu papel fundamental para o controle da motilidade espermática após a ejaculação e a possibilidade de intervenção farmacológica (O'Rand *et al.*, 2011; O'Rand *et al.*, 2016).

O gene *EPPIN* está localizado no cromossomo 20 humano (20q12-q13) e codifica uma proteína de secreção de 133 resíduos de aminoácidos, contendo um peptídeo sinal e duas sequências consenso de domínios inibidores de protease do tipo WFDC (Whey-acidic protein- type four disulfide core domain) [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) (Figura 1). A EPPIN é expressa de forma abundante pelo testículo e epidídimo, sendo encontrada na estrutura do espermatozoide onde atua como um centro de ancoragem para uma rede de interações proteína-proteína, fundamentais para a modulação da motilidade espermática após a ejaculação (Richardson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007a). A interação entre a EPPIN e a SEMG1 (semenogelina-1), principal proteína do plasma seminal e componente integral do coágulo de sêmen, no espermatozoide resulta na inibição temporária de sua motilidade (Mitra *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Esta só é recuperada após a clivagem da SEMG1 pela protease prostática PSA (*prostate-specific antigen*), cuja atividade também é modulada pela EPPIN (Wang *et al.*, 2007b).

Estudos com espermatozoides humanos e de modelos experimentais em primatas não humanos e roedores demonstraram que ligantes da EPPIN, como anticorpos anti-EPPIN e os compostos experimentais B4 e EP055, apresentaram efeito inibitório sobre a motilidade espermática via interação com a região da EPPIN responsável pela ancoragem da SEMG1 (O'Rand *et al.*, 2004; O'Rand *et al.*, 2011; O'Rand *et al.*, 2016; O'Rand *et al.*, 2018; Gomes *et al.*, 2023). Esses estudos representaram um passo significativo para o desenvolvimento da primeira classe de fármacos contraceptivos masculinos com atividade na inibição da motilidade/função espermática via interação com a EPPIN.

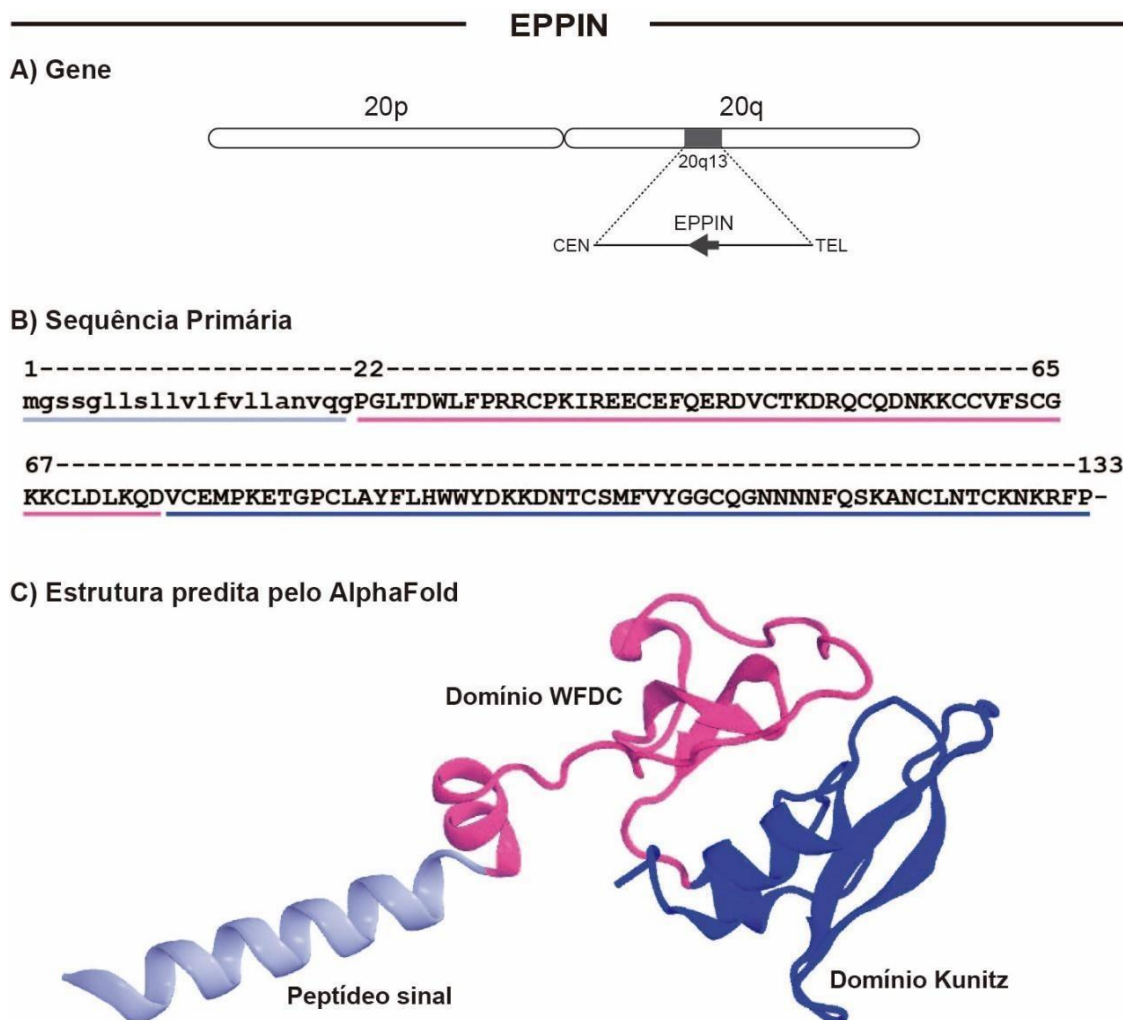


Figura 1: Ilustração esquemática do gene *EPPIN* e seu produto proteico. **A:** Localização do gene *EPPIN* no cluster WFDC no cromossomo 20 humano (20q12-q13). **B:** Sequência primária da EPPIN humana (NP_, identificando o peptídeo sinal (letras minúsculas) e os domínios de inibidores de protease do tipo WFDC (sublinhado rosa) e Kunitz (sublinhado azul escuro). **C:** Arranjo estrutural da EPPIN humana, de acordo com a plataforma de inteligência artificial AlphaFold: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O95925> (Jumper *et al.*, 2021), representando o peptídeo sinal (ciano), e os domínios WFDC (vermelho) e Kunitz (azul escuro).

Esse cenário reforça a necessidade do melhor entendimento sobre a regulação da expressão e mecanismos de ação da EPPIN na modulação da função espermática, bem como suas funções fisiológicas no sistema reprodutor masculino, incluindo aquelas relacionadas à sua interação com proteínas do plasma seminal, as quais precisam ser mais exploradas. Apesar da presença da EPPIN no espermatozoide humano ter sido demonstrada por diversas metodologias, os estudos realizados até o momento não exploraram detalhadamente sua distribuição celular no gameta masculino. Dessa forma, os resultados desse estudo visaram preencher lacunas acerca da caracterização da localização da EPPIN e contribuir para o entendimento da rede de interações proteína-proteína dessa proteína no espermatozoide, além da sua função como moduladora da motilidade espermática, e seu potencial envolvimento em outros eventos que antecedem a fertilização, como capacitação, hiperativação e reação acrossômica. Nossa pesquisa fornece resultados que contribui para o entendimento dos papéis da EPPIN quanto sua caracterização estrutural e funcional com o intuito do desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino não-hormonal

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar o perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano e sua colocalização com a SEMG1.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a expressão e localização da EPPIN nas regiões do espermatozoide humano ejaculado.
- 2) Investigar as regiões de colocalização entre a EPPIN e sua proteína de interação SEMG1 no espermatozoide humano ejaculado.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental do projeto foi dividido em duas partes principais conforme representado pela Figura 2. Na primeira parte do projeto realizamos a coleta das amostras do estudo através do laboratório de Reprodução Humana FMB/UNESP. Na segunda parte, verificamos a presença da EPPIN nos espermatozoides humanos por meio de ensaios de *Western blot*. Além disso, analisamos o perfil de distribuição da EPPIN no espermatozoide ejaculado e sua colocalização entre EPPIN e SEMG1.

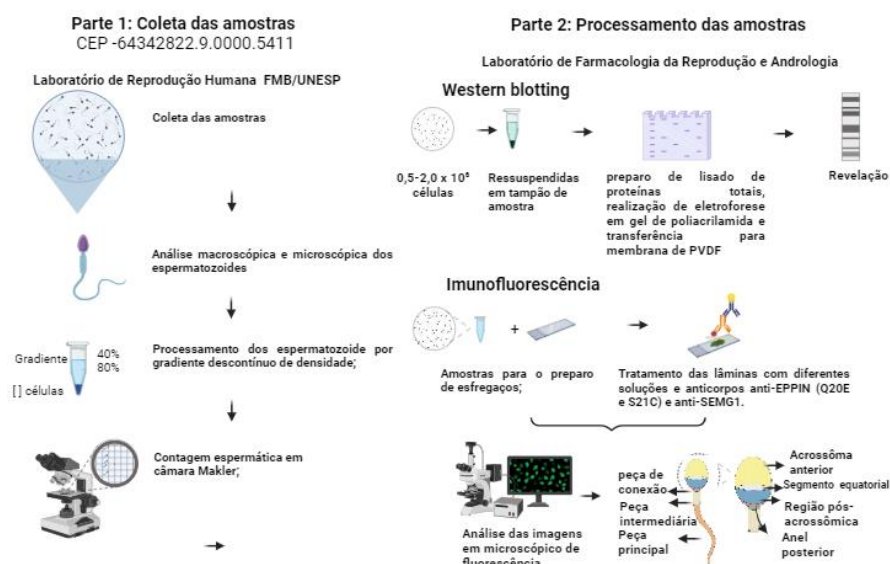


Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental do projeto segmentada em duas etapas: Coleta das amostras realizadas no laboratório de Reprodução Humana (FMB), conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e processamento para ensaios de Western blotting e imunofluorescência. Figura elaborada pela plataforma BioRender.com.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Amostras Biológicas e aspectos éticos

Para que o estudo fosse realizado e as amostras coletadas e analisadas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foi necessária aprovação do Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP) (CEP-FMB/UNESP: 64342822.9.0000.5411) descrevendo o estudo e elaboração do termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a aprovação da pesquisa e início das atividades, os espermatozoides humanos foram isolados a partir de amostras de sêmen a partir de voluntários maiores de 18 anos, capazes de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e realizaram a coleta das amostras em frascos estéreis por masturbação. Para tal,

foram excluídos: (i) portadores de doenças crônicas não transmissíveis, (ii) tabagistas ou adictos de drogas de abuso, (iii) portadores de doenças sexualmente transmissíveis ou de infecções do sistema geniturinário, (iv) indivíduos com parâmetros seminais fora dos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Após a coleta, as amostras passaram por análise macroscópica (tempo de liquefação, volume, viscosidade, coloração e pH), e análise microscópica (motilidade e morfologia). Além disso, realizamos o processamento das amostras por gradiente descontínuo de densidade por meio do preparo de tubo de centrifuga de 15 mL contendo gradiente de maior densidade 80% v/v, gradiente de menor densidade 40% v/v em um volume final de 0,5 mL diluído em meio HTF. Por último,

realizamos a contagem espermática para obtermos a concentração de espermatozoides para realizarmos ensaios de *Western blot* e imunofluorescência.

A coleta das amostras e a análise seminal foram realizadas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Para manter o sigilo amostras, retiramos a identificação como nome e horário da coleta e incubamos na estufa a 37°C para liquefação do sêmen e analisamos quanto aos parâmetros espermáticos segundo o protocolo da OMS.

Para o estudo, foram realizadas três coletas, na qual apresentamos o processamento e análise da amostra (Figura 2). Os resultados da análise seminal foram informados aos voluntários.

3.2.2. Anticorpos

Para os ensaios de *Western blot* e imunofluorescência, utilizamos anticorpos primários anti-EPPIN Q20E (epítipo na região N-terminal da EPPIN) e S21C

(epítopo na região C-terminal da EPPIN), sendo o primeiro produzido em coelho e cabra e o segundo, apenas em coelho (Tabela 1). Para os ensaios de colocalização, utilizamos os anticorpos anti-EPPIN Q20E, produzido em cabra, e o anticorpos anti-SEMG1 S20H, produzido em coelho (Tabela 1). Após caracterizar a localização da EPPIN nas diferentes regiões do espermatozoide, investigamos as potenciais regiões em que a EPPIN e sua proteína parceira SEMG1 se localizam no espermatozoide ejaculado. Além destes anticorpos primários, utilizamos anticorpos secundários diferentes conjugados com fluoróforos de colorações diferentes (Alexa-flúor 594 e 488) estudou com peroxidase, de acordo com a metodologia aplicada (Tabela 2).

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

Anticorpo	Animal	Epítopo alvo	Referência
Anti-EPPIN Q20E	Coelho e Cabra	²⁰ QGPSLADLLFPRRCPRFREE ³⁹	Wang <i>et al.</i> , 2005.
Anti-EPPIN S21C	Coelho	¹⁰³ SMFVYGGCQGNNNNFQSKANC ¹²³	O'Rand <i>et al.</i> , 2012.
Anti-SEMG-1	Coelho	³⁵³ RKNFNPGNYFTKGGADC ³⁶⁷	Wang <i>et al.</i> , 2005.

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

Anticorpo	Animal	Empresa	Catálogo
Alexa fluor 594 conjugated anti-rabbit	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-585-152
Alexa fluor 488 conjugated anti-rabbit	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-585-152
Peroxidase-conjugated AffinePure Anti-Goat	Boi	Jackson ImmunoResearch	805-035-180
Peroxidase-conjugated AffinePure Anti-Rabbit	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-035-152

3.2.3. Ensaios de Western blot

Ensaios de *Western blot* foram realizados conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2021). Resumidamente, amostras de espermatozoides ($0,5-2,0 \times 10^6$ células) foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM, glicerol 10% v/v, SDS 2% m/v e azul de bromofenol 0,01% m/v) e aquecidas a 85°C por 5 min. Após centrifugação ($12.000 \times g$, 5 min), os sobrenadantes foram coletados, suplementados com β -mercaptoetanol 5% v/v e incubados novamente a 85°C por 3 min. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS 4-12% e transferidas para membrana de PVDF. Em seguida, incubamos as membranas com os anticorpos primários anti-EPPIN Q20E e S21C (Tabela 1), seguido de incubação com anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase (Tabela 2). Os resultados foram revelados com reagente ECL Luminol e documentados em filmes de autorradiografia.

3.2.4. Ensaios de imunofluorescência

Os ensaios de Imunofluorescência foram realizados conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2021) com algumas modificações. Resumidamente, uma alíquota dos espermatozoides (1×10^7 células/mL) foi utilizada para confecção de esfregaços em lâminas silanizadas. Após secagem das lâminas em temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados com solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS por 25 min, seguido de incubação com solução de bloqueio (tampão PBS contendo BSA 1%, m/v) na presença de saponina 0,1% m/v por 25 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-EPPIN Q20E e S21C (Tabela 1) e para os ensaios de colocalização foi realizada uma etapa adicional de incubação com o anticorpo anti-SEMG1 (Tabela 1) em solução de bloqueio a 4°C durante a noite. No dia seguinte, lavamos as lâminas e as incubamos com os anticorpos secundários apropriados conjugados com fluoróforos Alexa-flúor 594 ou 488 (Tabela 2) por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida incubamos as lâminas com solução de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen) para marcação dos núcleos celulares ($10 \mu\text{M}$ por uma 1,5 h). Após a lavagem sob proteção da luz, montamos as lâminas com processamento seminal por gradiente descontínuo de densidade (INGAMED cat: 50080003) seguido de selagem com esmalte. Posteriormente analisamos os resultados em microscópio de epifluorescência. As imagens foram tratadas e sobrepostas com ajuste de brilho e contraste utilizando o software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) versão 1.54d.

Ensaios de controles negativos foram realizados na ausência de um ou de ambos os anticorpos primários. As imagens dos controles receberam os mesmos tratamentos de brilho e contraste utilizados para a EPPIN e SEMG1.

Para analisarmos o padrão de imunomarcação da EPPIN, dividimos o espermatozoide em regiões da cabeça: acrossoma anterior, região equatorial, região pós-acrossômica, anel posterior e dispersa (marcação presente em toda a cabeça sem definição predominante em uma região); e flagelo: peça de conexão, peça intermediária e peça principal (Figura 3). Essas imunomarcações foram expressas como percentual do total de células analisadas, somando-se os três experimentos independentes. Somente espermatozoides com a morfologia considerada normal foram analisados.

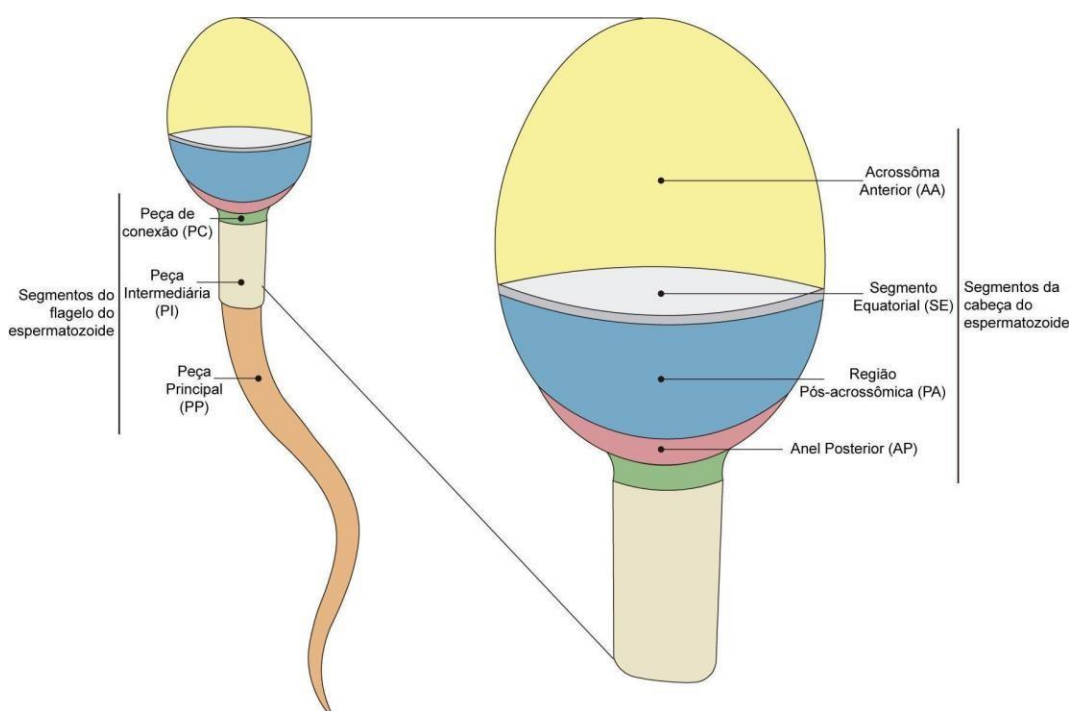


Figura 3. Representação esquemática da segmentação do espermatozoide humano: Cabeça: Amarelo - Acrossoma Anterior, Cinza - Segmento equatorial, Azul - Região pós-acrossômica, Vermelho - Anel posterior. Flagelo: Verde - Peça de conexão, Cinza - Peça intermediária, Laranja - Peça principal.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização da distribuição celular da proteína espermática EPPIN no espermatozoide humano.

Inicialmente, confirmamos a capacidade do anticorpo anti-EPPIN S21C de detectar a proteína EPPIN em extratos proteicos totais de espermatozoides

humanos por ensaio de *Western blot* (Figura 4). Observamos a presença de múltiplas bandas imunorreativas para o anticorpo anti-EPPIN S21C, incluindo em ~17 kDa, massa molecular esperada para o monômero EPPIN, além de bandas com massas moleculares aparentes em ~45 kDa e na faixa de ~75-90 kDa (Figura 4). É sabido que a EPPIN pode se apresentar como múltiplas bandas em ensaios de *Western blot*, devido à sua capacidade de formar dímeros e oligômeros resistentes a agentes redutores (Richardson *et al.*, 2001; Sivashanmugam *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007a; Silva *et al.*, 2012; Mariani *et al.*, 2020). Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura e validam o anticorpo anti-EPPIN S21C para os ensaios de imunofluorescência. Vale destacar que o anticorpo anti-EPPIN Q20E já foi previamente validado para este tipo de ensaio (Wang *et al.*, 2005).

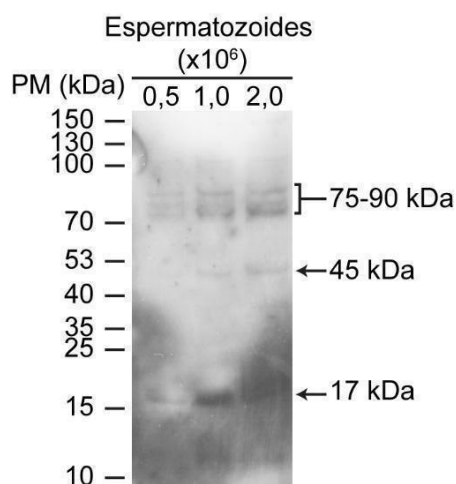


Figura 4. Detecção da EPPIN em extratos proteicos totais espermatozoides humanos por ensaio de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-EPPIN S21C. Setas indicam bandas imunorreativas de ~17, ~45, ~75-90 kDa. Ensaio realizado com 0,5 a 2,0 x 10⁶ células, conforme indicado. Os resultados são representativos de experimentos realizadas com uma amostra de sêmen.

Em seguida, caracterizamos o perfil de distribuição da EPPIN em toda extensão do espermatozoide humano utilizando os anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E. Observamos imunomarcção positiva para a EPPIN de forma diferencial na cabeça e flagelo dos espermatozoides para ambos os anticorpos (Figura 5). A análise quantitativa do padrão de imunomarcção positiva para a EPPIN na cabeça do espermatozoide revelou a presença deste alvo de forma dispersa em toda a cabeça na maior parte das células (Q20E: 50% e S21C 53,1%), além de padrões mais delimitados no acrossoma anterior (Q20E: 7,5% e S21C: 1,2%) e

região pós-acrossômica (Q20E 41,7% e S21C 41,7%), indicando um perfil diferencial de imunomarcção entre essas regiões (Tabela 3 e Figura 5). Adicionalmente, quase todos os espermatozoides analisados apresentaram imunomarcção positiva para a EPPIN no anel posterior (Q20E: 99,3% e S21C 100%), região que conecta a cabeça à peça de conexão do flagelo (Tabela 3, Figuras 3 e 5). Já no flagelo do espermatozoide, observamos abundante imunomarcção positiva para a EPPIN na peça de conexão (Q20E: 99,3% e S21C 100%), peça intermediária (Q20E: 99,3% e S21C 100%) e na peça principal (Q20E: 88,3 e S21C 34,1%) (Tabela 3; Figura 5). Nenhuma imunomarcção positiva foi observada quando experimentos foram realizados na ausência dos anticorpos primários (Anexo 1).

Tabela 3. Frequência de imunomarcção da EPPIN em regiões da cabeça e flagelo do espermatozoide utilizando os anticorpos anti-EPPIN Q20E e S21C.

Imunomarcção na cabeça	Anticorpo Q20E (%)	Anticorpo S21C (%)
Acrossoma anterior	7,5	1,2
Segmento equatorial	0,7	0,0
Região pós-acrossômica	41,8	41,8
Anel posterior	99,3	100
Dispersa	50,0	53,2
Sem marcação na cabeça	0,7	3,8
Imunomarcção no flagelo	Anticorpo Q20E	Anticorpo S21C
Peça de conexão	99,3	100
Peça intermediária	99,3	100
Peça principal	88,4	34,2
Sem marcação no flagelo	0,7	0,0
Quantidade de células analisadas	Anticorpo Q20E	Anticorpo S21C
	146	79

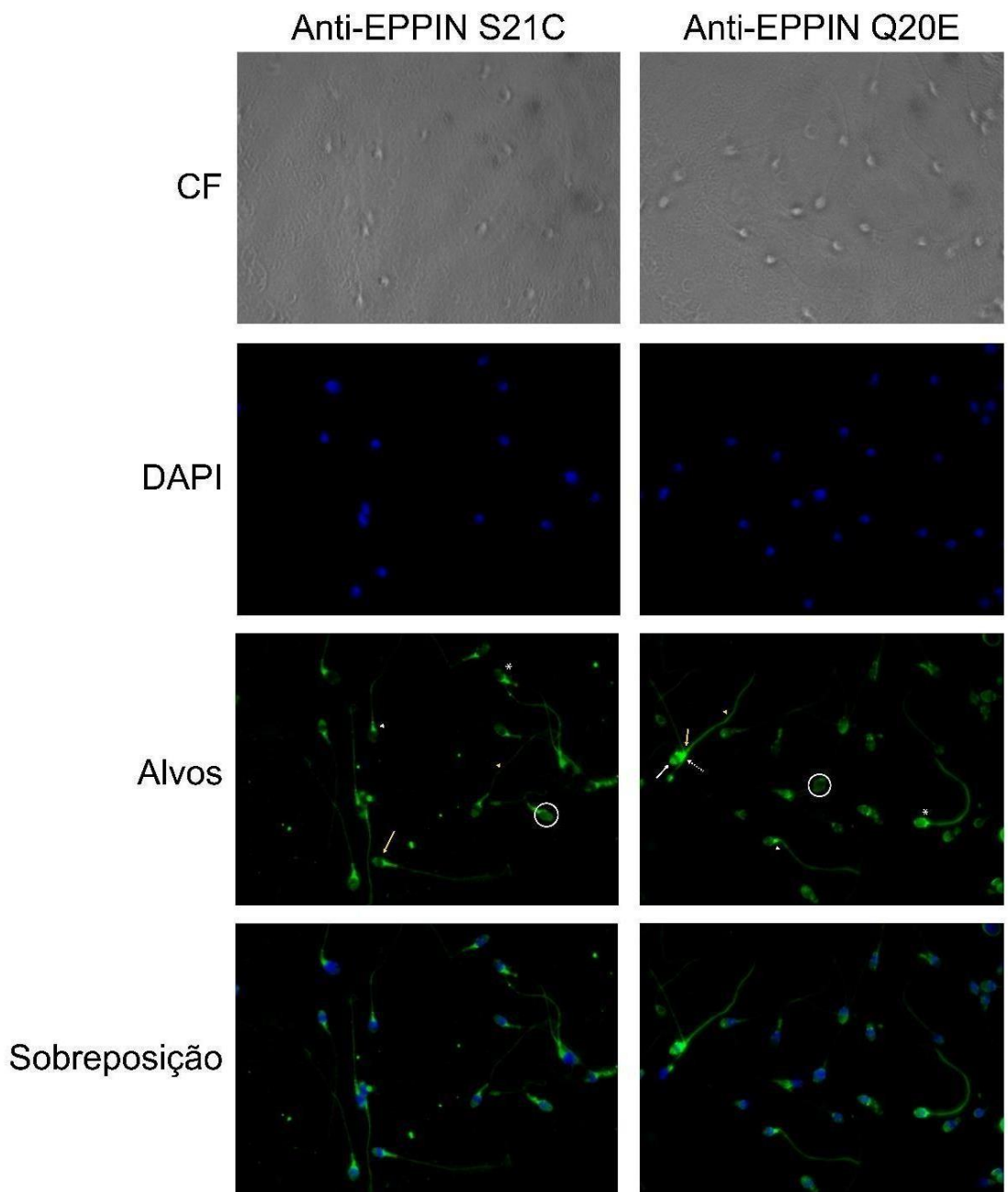


Figura 5. Imunolocalização da EPPIN nos diferentes segmentos de marcações em espermatozoides humanos ejaculados. As diferentes regiões estão demarcadas de acordo com os símbolos: Imunomarcação na região da cabeça: Seta branca na cabeça - marcação acrossoma. Seta branca reduzida - marcação pós-acrossoma. Círculo branco em volta da cabeça - marcação dispersa. Ponta da seta branca - marcação da peça de conexão. Asterisco branco - marcação do anel posterior. Imunomarcação do flagelo: Seta amarela - imunomarcação na peça intermediária. Seta amarela pequena - imunomarcação na peça principal. DAPI: marcação de núcleo por 4'6-diamidino-2-fenilindol (azul). CF representa o controle de fase para representar cada espermatozoide. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes. Barra de escala: 25 um.

Frente à demanda por novos métodos masculinos para o controle da natalidade, a EPPIN representa um dos principais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contraceptivos masculinos não hormonais que podem afetar a função espermática (Drevet, 2018). Neste estudo, caracterizamos de forma detalhada o perfil de localização da EPPIN no espermatozoide humano, um parâmetro importante para a análise de suas funções e avaliação do efeito espermiostático de seus potenciais ligantes (Mariani *et al.*, 2023).

Estratégias experimentais diferentes deram lastro à hipótese de que a EPPIN atua como elemento central de uma rede de interação proteína-proteína com papel essencial na função espermática (O'Rand *et al.*, 2011; Mariani *et al.*, 2023). Nesse contexto, a presença da EPPIN no flagelo dos espermatozoides ejaculados humanos fornece suporte para participação desta proteína em eventos bioquímicos e moleculares para o controle da motilidade espermática (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007a). Nossos resultados foram de encontro com esses estudos, visto que observamos imunomarcagem positiva para a EPPIN nas diferentes segmentações do flagelo (peça de conexão, intermediária e principal) com ambos os anticorpos Q20E e S21C em quase todos os espermatozoides analisados (Tabela 3). Dessa forma, é possível propor que a ausência da EPPIN no flagelo do espermatozoide pode ser um marcador de disfunção do gameta masculino.

Além disso, o perfil de imunomarcagem positiva para a EPPIN na cabeça do espermatozoide observado em nosso estudo sugere seu envolvimento em outras funções associadas à fertilidade do gameta masculino, como a reação acrossômica. Vale ressaltar que a SEMG1, principal proteína ligante da EPPIN oriunda do plasma seminal, é capaz de inibir a reação acrossômica e a fertilização do oócito em espermatozoides humanos e de modelos experimentais, como camundongos (Robert & Gagnon, 1999; de Lamirande, 2007; Kawano & Yoshida, 2007; de Lamirande & Lamothe, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2020). Anticorpos anti-EPPIN também demonstraram capacidade de inibir a reação acrossômica espontânea e induzida por ionóforo de cálcio em espermatozoides humanos (Zhang *et al.*, 2010). Neste estudo, Zhang *et al.* (2010) demonstraram que a indução de reação acrossômica com ionóforo de cálcio alterou a localização da EPPIN na cabeça do espermatozoide humano, que passou a ser predominantemente no segmento equatorial. De forma consistente, observamos baixa frequência de imunomarcagem positiva para a EPPIN nesta região da cabeça

do espermatozoide, visto que nosso estudo foi realizado com espermatozoides recém-coletados e que não foram expostos a indutores da reação acrossômica. Nossos resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais para investigar o potencial envolvimento da EPPIN na reação acrossômica, o que pode abrir novas perspectivas para sua exploração como alvo para contracepção masculina, devido ao papel essencial deste evento espermático na reprodução.

4.2. Colocalização da EPPIN e SEMG-1 no espermatozoide humano.

Em virtude da relevância da interação EPPIN/SEMG1 para a fertilidade masculina, um dos objetivos do nosso estudo foi a realização da colocalização entre a EPPIN e SEMG1 para entendermos sua distribuição em espermatozoides humanos ejaculados. Observamos padrão de imunomarcção positiva para a SEMG1 no flagelo em toda sua extensão (peça de conexão, peça intermediária e peça principal) e na cabeça, com maior intensidade no acrossoma anterior, região pós-acrossômica e anel posterior (Figura 6). Ensaios de controle negativo realizaram na ausência de um dos anticorpos utilizados demonstraram a especificidade das imunomarcações observadas (Anexo I).

Estudos realizados com a EPPIN demonstraram que ela atua como um centro para ancoragem de diversas proteínas oriundas do próprio espermatozoide, como lactotransferrina (LTF), clusterina (CLU), e do plasma seminal, como SEMG1, resultando em um complexo multiproteico conhecido como EPC (*Eppin Protein Complex*) (Wang *et al.*, 2007a; O'Rand *et al.*, 2011). Vale destacar que a SEMG1 é uma proteína multifuncional, atuando não apenas na inibição da motilidade espermática, mas também na modulação da capacitação espermática e hiperativação, formação do coágulo de sêmen e proteção do espermatozoide no ambiente uterino (Robert & Gagnon, 1999; Mitra *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2020). Camundongos nos quais o gene *Svs2* (ortólogo do *SEMG1* humano) foi deletado apresentaram grau severo de subfertilidade devido à morte prematura dos espermatozoides no trato reprodutor feminino (Kawano *et al.*, 2014). Além disso, macacos que se tornaram inférteis após a imunização com a EPPIN recombinante humana apresentaram alterações na liquefação do sêmen, evento mediado pela ação hidrolítica da serino protease PSA sobre a SEMG1 (O'Rand *et al.*, 2004). Dessa forma, é provável que os efeitos diversos da SEMG1 sobre a função espermática dependam da sua ligação à EPPIN. Nossos resultados vão de encontro a esta hipótese, visto que observamos colocalização entre as duas

proteínas tanto na cabeça quanto no flagelo dos espermatozoides. Vale destacar, entretanto, que experimentos adicionais serão necessários para quantificar o perfil de colocalização da EPPIN com a SEMG1 no espermatozoide humano.

Em conjunto, nossos resultados auxiliam na compreensão da EPPIN e seu mecanismos de ligação fornecendo novas perspectivas a respeito dos mecanismos que podem estar envolvidos no controle da motilidade do espermatozoide e sua exploração como alvo terapêutico para elaboração de novas estratégias farmacológicas masculinas para o controle de natalidade. .

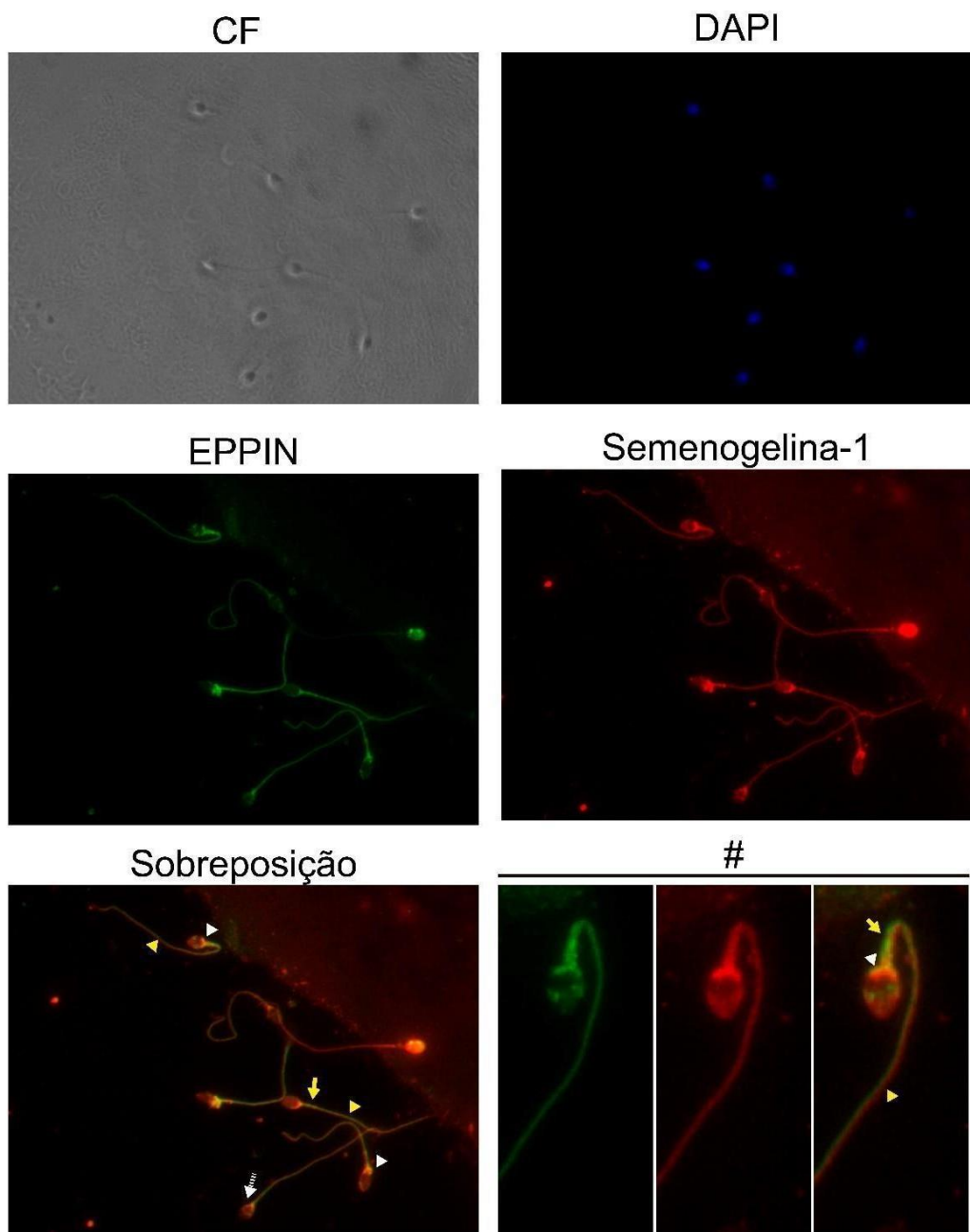


Figura 6. Colocalização EPPIN/SEMG-1 nos diferentes segmentos de marcações em espermatozoides humanos ejaculados. As diferentes regiões estão demarcadas de acordo com os símbolos: Imunomarcação na região da cabeça: Seta branca pontilhada - marcação pós-acrossoma. Círculo branco em volta da cabeça - marcação dispersa. Ponta da seta branca - marcação da peça de conexão. Imunomarcação do flagelo: Seta amarela - imunomarcação na peça intermediária. Seta amarela pequena - imunomarcação na peça principal. O resultado é representativo de 1 imagem do experimento de colocalização. Legenda: CF corresponde a controle de fases. Sobreposição representa a junção entre EPPIN e SEMG1 e # corresponde ao recorte entre EPPIN (verde), SEMG1 (vermelho) e colocalização entre EPPIN e SEMG1. Barra de escala: 25 μ m.

5. Conclusão

Nossos resultados fornecem novos entendimentos sobre o papel da EPPIN na função espermática e fertilidade masculina. A caracterização pormenorizada do seu perfil de distribuição na cabeça e do flagelo do espermatozoide humano abre portas para novas abordagens para investigações acerca da EPPIN como alvo multifuncional para contracepção masculina visando a inibição de eventos espermáticos como motilidade e reação acrossômica. Do ponto de vista fisiológico, oferecemos evidências adicionais da relevância da EPPIN como proteína espermática essencial para que a SEMG1 promova seus efeitos modulatórios sobre a função espermática, tanto aqueles que ocorrem via flagelo (motilidade e hiperativação) quanto via cabeça (reação acrossômica). . Portanto, este estudo reforça a relevância da continuidade dos estudos sobre a EPPIN na fertilidade masculina visando sua potencial aplicação como alvo para contracepção masculina, cujo desenvolvimento contribuirá para a queda das taxas de gestações não-planejadas e para melhor distribuição das tarefas contraceptivas entre homens e mulheres.

6. Referências

Amory, J. K. (2016). Male contraception. **Fertil Steril** 106(6): 1303-1309. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.036.

Avellar, M. C. W., Hinton, B. T. (2019). Epididymis. **Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)**. I. Huhtaniemi and L. Martini. Oxford, Academic Press: 807-813 DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.65180-2.

de Lamirande, E. (2007). Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. **Semin Thromb Hemost** 33(1): 60-68. DOI: 10.1055/s-2006-958463.

de Lamirande, E., Lamothe, G. (2010). Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. **Human Reprod** 25(7): 1619-1630. DOI: 10.1093/humrep/deq110.

Drevet, J. R. (2018). Epididymal approaches to male contraception. **Basic Clin Androl** 28(1): 12. DOI: 10.1186/s12610-018-0078-y.

Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. D. N. Jimmy, Ph.D, M. P. Tony et al. St Louis, Academic Press: 3-54 DOI: 10.1016/B978-012515400-0/50006-3.

Gervasi, M. G., Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology** 5(2): 204-218. DOI: 10.1111/andr.12320.

Gomes, A. A. S., Santos, N. C. M., Rosa, L. R., Borges, R. J., Fontes, M. R. M., Hamil, K. G., O'Rand, M. G., Silva, E. J. R. (2023). Interactions of the male contraceptive target EPPIN with semenogelin-1 and small organic ligands. **Sci Rep** 13(1): 14382. DOI: 10.1038/s41598-023-41365-1.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., *et al.* (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature** 596(7873): 583-589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., *et al.* (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. **Proc Natl Acad Sci USA** 111(11): 4145-4150. DOI: 10.1073/pnas.1320715111.

Kawano, N., Yoshida, M. (2007). Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. **Biol Reprod** 76(3): 353-361. DOI: 10.1095/biolreprod.106.056887.

Kent, K., Johnston, M., Strump, N., Garcia, T. X. (2020). Toward Development of the Male Pill: A Decade of Potential Non-hormonal Contraceptive Targets. **Front Cell Dev Biol** 8(61). DOI: 10.3389/fcell.2020.00061.

Kopf, G. S. (2008). Approaches to the identification of new nonhormonal targets for male contraception. **Contraception** 78(4, Supplement 1): S18-S22.

Long, J. E., Lee, M. S., Blithe, D. L. (2019). Male contraceptive development: Update on novel hormonal and nonhormonal methods. **Clin Chem** 65(1): 153-160. DOI: 10.1373/clinchem.2018.295089.

Marchi, N. M., Alvarenga, A. T. d., Osis, M. J. D., Godoy, H. M. d. A., Guimarães, M. C. B., Bahamondes, L. (2011). Consequências da vasectomia: experiência de homens que se submeteram à cirurgia em Campinas (São Paulo), Brasil. **Saúde Soc** 20(3): 568-578. DOI: 10.1590/S0104-12902011000300004.

Mariani, N. A. P., Camara, A. C., Silva, A. A. S., *et al.* (2020). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. **Mol Cell Endocrinol** 506: 110754. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110754.

Mariani, N. A. P., Silva, J. V., Fardilha, M., Silva, E. J. R. (2023). Advances in non-hormonal male contraception targeting sperm motility. **Hum Reprod Update** 29(5): 545-569. DOI: 10.1093/humupd/dmad008.

Mitra, A., Richardson, R. T., O'Rand, M. G. (2010). Analysis of recombinant human Semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. **Biol Reprod** 82(3): 489-496. DOI: 10.1095/biolreprod.109.081331.

O'Rand, M. G., Silva, E. J. R., Hamil, K. G. (2016). Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. **Pharmacol Ther** 157: 105-111. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.11.004.

O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Hamil, K. G., Silva, E. J., Richardson, R. T. (2011). Epididymal protein targets: A brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. **J Androl** 32(6): 698-704. DOI: 10.2164/jandrol.110.012781.

O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Sivashanmugam, P., *et al.* (2004). Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with Eppin. **Science** 306(5699): 1189-1190. DOI: 10.1126/science.1099743.

O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T., Zelinski, M. (2018). Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. **PLOS ONE** 13(4): e0195953. DOI: 10.1371/journal.pone.0195953.

Padilha, T., Sanches, M. A. (2020). Participação masculina no planejamento familiar: revisão integrativa da literatura. **Interface (Botucatu)** 24: e20047. DOI: 10.1590/interface.200047.

Piotrowska, K., Wang, C., Swerdloff, R. S., Liu, P. Y. (2017). Male hormonal contraception: hope and promise. **Lancet Diabetes Endocrinol** 5(3): 214-223. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)00034-6.

Richardson, R. T., Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., Moore, P. A., Ruben, S. M., French, F. S., O'Rand, M. (2001). Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene** 270(1-2): 93-102. DOI: S0378111901004620.

Robert, M., Gagnon, C. (1999). Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. **Cell Mol Life Sci** 55(6): 944-960.

Sakaguchi, D., Miyado, K., Iwamoto, T., Okada, H., Yoshida, K., Kang, W., Suzuki, M., Yoshida, M., Kawano, N. (2020). Human Semenogelin 1 promotes sperm survival in the mouse female reproductive tract. **Int J Mol Sci** 21(11). DOI: 10.3390/ijms21113961.

Silva, A. A. S., Raimundo, T. R. F., Mariani, N. A. P., Kushima, H., Avellar, M. C. W., Buffone, M. G., Paula-Lopes, F. F., Moura, M. T., Silva, E. J. R. (2021). Dissecting EPPIN protease inhibitor domains in sperm motility and fertilizing ability: repercussions for male contraceptive development. **Mol Hum Reprod** 27(12): 1-15. DOI: 10.1093/molehr/gaab066.

Silva, E. J. R., Hamil, K. G., O'Rand, M. G. (2013). Interacting proteins on human spermatozoa: Adaptive evolution of the binding of semenogelin I to EPPIN. **PLoS ONE** 8(12): e82014. DOI: 10.1371/journal.pone.0082014.

Silva, E. J. R., Patrão, M. T. C. C., Tsuruta, J. K., O'Rand, M. G., Avellar, M. C. W. (2012). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. **Mol Reprod Dev** 79(12): 832-842. DOI: 10.1002/mrd.22119.

Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., French, F. S., O'Rand, M. G., Richardson, R. T. (2003). Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. **Gene** 312: 125-134. DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00608-5.

Teal, S., Edelman, A. (2021). Contraception selection, effectiveness, and adverse effects: A review. **JAMA** 326(24): 2507-2518. DOI: 10.1001/jama.2021.21392.

Thirumalai, A., Amory, J. K. (2021). Emerging approaches to male contraception. **Fertil Steril** 115(6): 1369-1376. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.047.

Wang, Z., Widgren, E. E., Richardson, R. T., O'Rand, M. G. (2007a). Characterization of an Eppin Protein Complex from human semen and spermatozoa. **Biol Reprod** 77(3): 476-484. DOI: 10.1095/biolreprod.107.060194.

Wang, Z., Widgren, E. E., Richardson, R. T., Orand, M. G. (2007b). Eppin: a molecular strategy for male contraception. **Soc Reprod Fertil Suppl** 65: 535-542.

Wang, Z., Widgren, E. E., Sivashanmugam, P., O'Rand, M. G., Richardson, R. T. (2005). Association of Eppin with Semenogelin on human spermatozoa. **Biol Reprod** 72(5): 1064-1070. DOI: 10.1095/biolreprod.104.036483.

Zhang, J., Ding, X., Bian, Z., Xia, Y., Lu, C., Wang, S., Song, L., Wang, X. (2010). The effect of anti-eppin antibodies on ionophore A23187-induced calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa. **Hum. Reprod.** 25(1): 29-36. DOI: 10.1093/humrep/dep356.

ANEXOS

Anexo 1. Figura suplementar

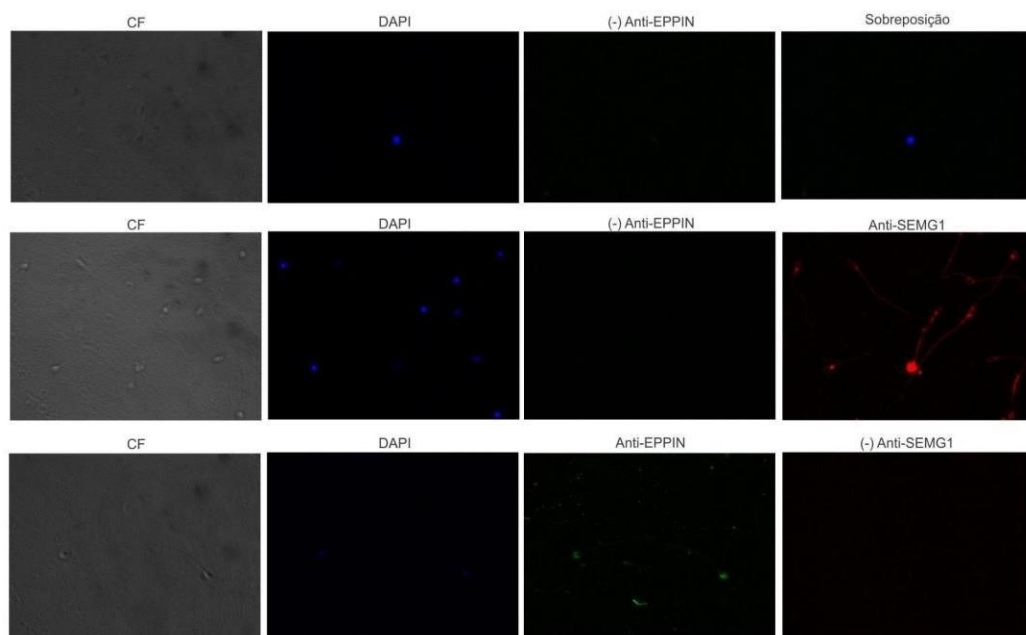


Figura Suplementar 1. Controle negativos na ausência de anticorpo primário (-). A primeira fileira apresenta imagem do controle negativo para EPPIN e SEMG-1. A fileira mediana apresenta controle negativo da EPPIN na presença de imunomarcacão da SEMG-1. Fileira inferior apresenta os controles negativos para SEMG-1 na presença de imunomarcacão da EPPIN. Resultados representativos de três experimentos independentes. Barra de escala: 25 μ m.

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

(Participante maior de 18 anos)

CONVIDO, o Senhor para participar do Projeto de Pesquisa intitulado **“Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) no espermatozoide humano: um alvo para contracepção masculina”**, que será desenvolvido por mim **Ana Clara Ferrari Themer** (Aluna de graduação em Enfermagem), com orientação do pesquisador Professor Dr. **Erick José Ramo da Silva** (Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”).

Estou desenvolvendo uma pesquisa na área da contracepção masculina. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar amostras de sêmen, que serão identificadas com o nome e horário da coleta. Serão analisadas quanto aos parâmetros espermáticos segundo o protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS). Os resultados da análise do sêmen serão informados aos voluntários. **(O projeto exposto possui risco mínimo para os voluntários, devido apresentar fatores de constrangimento. Para redução dos riscos, os voluntários terão acesso a uma sala reservada e privativa para a realização da coleta da amostra, e serão esclarecidas todas as suas dúvidas sobre o procedimento ou de outros aspectos do estudo. Não ocorrerá, em hipótese alguma, a divulgação de dados confidenciais ou coerção para participar da pesquisa).**

Informo que o material biológico colhido do Senhor não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenado no Departamento de Biofísica e Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista". Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que o Senhor assine nova autorização para utilização desse material. Além disso, o Senhor responderá um questionário que levará uns 15 minutos de duração.

Seu benefício em participar será a colaboração voluntária para avanços novos métodos de controle da natalidade focados no homem (contracepção masculina), oferecendo aos casais novas formas reversíveis e seguras prevenção da gravidez. Dessa forma, sua participação no projeto auxiliará para a geração de novos conhecimentos na área e colaborará para o planejamento familiar.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Será garantido o direito à assistência integral e gratuita a você em caso de quaisquer danos decorrentes da participação nesta pesquisa e pelo tempo que for necessário. Você tem direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 cópias iguais, o qual 01 cópia será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será

arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12:00 horas e das 13:30 às 17:00 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido retirada todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas.

Botucatu, ____/____/____

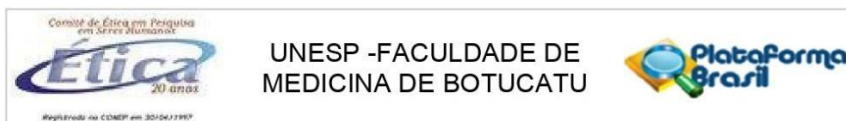
Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome [Ana Clara Ferrari Themer](#)
Endereço: Ruas Dos Costas, nº 585 - Vila Aparecida
Telefone: (14) 997783524
Email: ana.f.themer@unesp.br

Nome [Erick José Ramo da Silva](#)
Endereço:
Telefone: (11) 985444389
Email: ejr.silva@unesp.br

Anexo 3. Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) no espermatozoide humano: um alvo para contracepção masculina.

Pesquisador: ERICK JOSE RAMO DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64342822.9.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Farmacologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.766.492

Apresentação do Projeto:

A gravidez não planejada constitui um grande problema de saúde global, sendo a estatística mundial cerca de 40%. Esse dado reflete a necessidade de ampliação dos métodos de contracepção, principalmente para o público masculino, visto estarem disponíveis somente dois métodos: vasectomia e preservativo. Nesse sentido, a proteína espermática EPPIN (Epididymal protease inhibitor) é um alvo farmacológico promissor para a contracepção masculina devido ao seu papel fundamental para o controle da motilidade espermática após a ejaculação. A EPPIN é expressa no testículo e epidídimo, e está presente na superfície dos espermatozoides humanos, onde atua inibindo a motilidade espermática via interação com a proteína seminal SEMG1 (semenogelina-1). Sua relevância para a contracepção masculina é evidenciada pelos

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

efeitos inibitórios de anticorpos anti-EPPIN e de ligantes orgânicos de baixo peso molecular sobre a motilidade do espermatozoide humano. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a EPPIN modula a motilidade espermática, bem como sua distribuição celular no espermatozoide humano ejaculado. Assim, esta pesquisa tem como objetivo investigar a expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano e sua colocalização com a SEMG1.

Para isso, realizaremos ensaios de Western blot e imunofluorescência nas amostras de espermatozoides humanos, coletados no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os voluntários doadores de sêmen nesse estudo deverão ser maiores de 18 anos, tendo como critérios de exclusão: (i) portadores de doenças crônicas não transmissíveis, (ii) tabagistas ou adictos de drogas de abuso, (iii) portadores de doenças sexualmente transmissíveis ou de infecções do sistema geniturinário, (iv) indivíduos com parâmetros seminais fora dos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). A realização deste projeto contribuirá para o melhor entendimento dos papéis da EPPIN na reprodução, fomentando inovação radical em estratégias farmacológicas para o controle da natalidade. Trata-se de um estudo experimental que visa investigar a expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano, visando ampliar o conhecimento acerca do seu envolvimento em eventos associados à função espermática. O grupo amostral será constituído por pacientes que fornecerem amostras de sêmen para exame de espermograma, conduzido no Centro de Reprodução Assistida da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP. Não será feita nenhuma intervenção ou tratamento nesses pacientes.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP Município: BOTUCATU	
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.766.492

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano e sua colocalização com a SEMG1, visando ampliar o conhecimento acerca do seu envolvimento em eventos associados à função espermática.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a expressão da EPPIN nas regiões do espermatozoide humano ejaculado.
- Investigar a colocalização entre a EPPIN e sua proteína de interação SEMG1 no espermatozoide humano ejaculado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os os riscos associados ao protocolo são mínimos e incluem o risco de constrangimento para a coleta do material. Para mitigar tais riscos, in formamos que o voluntário terá à sua disposição uma sala reservada e privativa para coleta do material em horário agendado; será instruído de forma acolhedora para que se sinta confortável e terá todas as suas dúvidas esclarecidas antes da realização da coleta do material biológico.

Benefícios:

Colaboração voluntária para avanços na contracepção masculina para expandir novas formas farmacológicas reversíveis para o sexo masculino.

Dessa forma, a participação dos voluntários auxiliará na caracterização de um alvo terapêutico para a contracepção masculina focada na perda da função do espermatozoide. Trata-se de uma estratégia radicalmente inovadora, cujo desenvolvimento colaborará para o planejamento familiar e promoção de igualdade de gênero nas tarefas associadas ao controle de natalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante, sendo um estudo experimental que visa investigar a expressão e distribuição celular da EPPIN no espermatozoide humano, visando ampliar o conhecimento acerca do seu envolvimento em eventos associados à função espermática. O grupo amostral será constituído por pacientes que fornecerem amostras de sêmen para exame de espermograma, conduzido no Centro de Reprodução Assistida da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP. Não será feita nenhuma intervenção ou tratamento nesses pacientes.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n		CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior		
UF: SP	Município: BOTUCATU	
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: cep@fmb.unesp.br	

Continuação do Parecer: 5.766.492

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de anuência institucional(HC/FMB). projeto, folha de rosto e TCLE devidamente modificado e carta resposta.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do PROJETO de Pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 21/11/2022, do PROJETO de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO. O projeto de pesquisa deverá ter início somente após aprovação deste CEP.

Ao final da execução da pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1952281.pdf	11/11/2022 15:15:08		Aceito
Outros	Encaminhamento_Pendencias_CEP_Ana Clara_11112022.pdf	11/11/2022 15:14:42	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartas_Anuencia.pdf	11/11/2022 15:11:33	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_IC_AnaClara_final_rev2.pdf	11/11/2022 15:08:36	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Revisado_Final.pdf	11/11/2022 15:08:08	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.766.492

Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado_Final.pdf	11/11/2022 15:08:08	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Ana_Clara_Assinada.pdf	02/09/2022 17:26:59	ERICK JOSE RAMO DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 21 de Novembro de 2022

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Anexo 4. Aprovação do Hospital das Clínicas para elaboração do estudo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - UNESP

ANUÊNCIA DO HCFMB

DECLARO que tenho CIÊNCIA e AUTORIZO a realização do projeto de pesquisa intitulado
Avaliação do perfil de expressão e distribuição celular da EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor)
no espermatozoide humano: um alvo para contracepção masculina.



a ser desenvolvido pelo (a) pesquisador (a)

Ana Clara Ferrari Theme

sob a orientação do (a)

Erick José Ramo da Silva

tendo como cenário de pesquisa o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
de Botucatu (HCFMB).

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos
requisitos da Resolução 466/12 CNS e suas complementares, comprometendo-se o (a)
mesmo (a) a utilizar os dados pessoais dos participantes da pesquisa, exclusivamente,
para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações
em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

DECLARO ainda, que o projeto de pesquisa não deverá acarretar nenhum ônus
financeiro para o SUS ou para o participante da pesquisa. Caso contrário, tenho
a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem
penalização alguma.

Antes de iniciar a pesquisa, o (a) pesquisador (a) deverá apresentar a esta Instituição
o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Botucatu, 29 de Agosto de 2022


Prof. Assoc. André Luis Balbi
Superintendente do HCFMB

Superintendência do Hospital das Clínicas
Distrito de Rubião Júnior s/n – CEP 18618-970
Botucatu | São Paulo | Brasil
Tel. (14) 3811-6215 | 3811-6218 | 3811-6100 | Fax. 3882-5387
www.hcfmb.unesp.br | pesquisadgaa@hcfmb.unesp.br

Sipe: 339 - 2022
ID HCFMB: 1381311
Acadêmico/ rotina hospitalar
Acadêmico/ com fomento
☒ Acadêmico/ sem fomento
Patrocinado/UPECLIN
Aguardando fomento
Outros

