

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo tese
será disponibilizado somente a
partir de 13/11/2024.



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

**ESTUDO DA PROTEÍNA ESPERMÁTICA EPPIN COMO ALVO PARA
CONTRACEPÇÃO MASCULINA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, INTERAÇÃO
PROTEÍNA-PROTEÍNA E POTENCIAIS MECANISMOS DE AÇÃO.**

Botucatu

2024

NOEMIA APARECIDA PARTELLI MARIANI

**ESTUDO DA PROTEÍNA ESPERMÁTICA EPPIN COMO ALVO PARA
CONTRACEPÇÃO MASCULINA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, INTERAÇÃO
PROTEÍNA-PROTEÍNA E POTENCIAIS MECANISMOS DE AÇÃO.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Candidata: Me. Noemia Aparecida Partelli Mariani

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mariani, Noemia Aparecida Partelli.

Estudo da proteína espermática EPPIN como alvo para
contracepção masculina : caracterização estrutural,
interação proteína-proteína e potenciais mecanismos de ação
/ Noemia Aparecida Partelli Mariani. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Erick José Ramo Silva
Capes: 21005001

1. Proteínas. 2. Espermatozoides. 3. Anticoncepção.
4. Interação proteína-proteína.

Palavras-chave: EPPIN; Espermatozoide; Semenogelina-1.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE NOEMIA APARECIDA PARTELLI MARIANI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 13 dias do mês de novembro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Sala da Pós-graduação na Central de Aulas IBB, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de NOEMIA APARECIDA PARTELLI MARIANI, intitulada **Estudo da proteína espermática EPPIN como alvo para contracepção masculina: caracterização estrutural, interação proteína-proteína e potenciais mecanismos de ação.** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Profª. Drª. MARGARIDA SÂNCIO DA CRUZ FARDILHA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Médicas / Universidade de Aveiro, Portugal, Prof. Assistente Doutor ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO (Participação Presencial) do(a) Programa de Pós-graduação em Ciência Animal / Universidade do Oeste Paulista - UNOPAR, Profa. Dra. MARIA ANGELICA SPADELLA (Participação Presencial) do(a) Faculdade de Medicina de Marília (Famema), Profa. Dra. RAQUEL FANTIN DOMENICONI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA



Auxílios Financeiros (Bolsas)

CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível Superior - Processos:
88887.496465/2020-00
88887.657625/2021-00)

FAPESP

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processos: 2020/04841-3,
2022/10159-6)

CNPq

(Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo:
442218/2023-0)

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me conceder força e coragem em todos os momentos, principalmente nos grandes desafios durante a pós-graduação.

Agradeço ao meu noivo, em breve marido, Lucas Satiro pelo seu amor e parceria, por apoiar minhas decisões durante o doutorado, entender e incentivar os períodos de estágio no exterior, e por sempre acreditar em mim e no nosso amor, que só continua crescendo a cada desafio.

Agradeço aos meus amados pais Dirceu Mariani e Jucilene Partelli Mariani e irmã Isadora Partelli Mariani, que em meio a tanta saudade me apoiam e acreditam em mim. Vocês são minha inspiração de luta, amor e dedicação.

Agradeço a toda minha família, em especial minha madrinha Rosilã Mariani e tia Palma Mariani que sempre me apoiaram e ao lado da minha mãe são inspirações de mulheres amorosas e fortes.

Agradeço a minha sogra Valéria Santos por sempre incentivar a minha jornada e me acolher na vida como uma filha.

Agradeço aos meus amigos de Alfredo Chaves, ES por torcerem e vibrarem de alegria em todas as minhas conquistas. É muito gratificante sentir que o nosso carinho e apreço nunca mudou e nossa amizade continua bonita como há 15 anos atrás.

Agradeço a todos meus colegas e amigos de laboratório pela ajuda nos experimentos e todo companheirismo e carinho. Em especial agradeço a Natália Santos, Alexandre Andrade, Beatriz Rezende, Poliana Martins, Juliana Bizzotto, Isabela Andrade e Célio Fernandes por todos os momentos compartilhados.

Agradeço Tamiris Raimundo, Alan Silva e Ediléia De Paula, que mesmo não estando mais no departamento tenho certeza de que nossa amizade vai muito mais além. Agradeço muito por um ser porto-seguro do outro e pelo apoio e amor que continuamos compartilhando.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Erick Silva, que sempre me incentivou, acreditou no meu potencial e me mostrou o caminho para me tornar uma profissional preocupada em sempre entregar o meu melhor. Muito obrigada pelas oportunidades que o senhor me deu desde 2017, sou muito grata e feliz por todos os ensinamentos que o senhor me proporcionou.

Agradeço à Prof. Dra. Polina Lishko, Prof. Dr. Darío Krapf e Prof. Dr. Mariano Buffone pelo acolhimento em seus laboratórios no exterior e reuniões e conversas extremamente

enriquecedoras. Os períodos que vivi em cada laboratório certamente me trouxeram experiências científicas e pessoais únicas.

Agradeço de coração aos amigos que fiz durante meus períodos no exterior, tanto pela valiosa ajuda científica quanto pelos momentos inesquecíveis fora do laboratório. Vocês tornaram essas experiências leves e especiais. Em especial, agradeço a Citlalli Vergara, Qingwei Niu, Débora Carolina, Analia Novero, Cintia Stival e Tomas Steeman.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Biofísica e Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP por todos os ensinamentos, conversas e orientações que certamente impactaram positivamente na minha formação.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Biofísica e Farmacologia, Ana Cristina Murcia de Souza, Paulo Cesar Mioni, Luís A. de Oliveira e Dr. Hélio Kushima por todo apoio para a realização do meu projeto, conversas e amizade.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Biofísica e Farmacologia pela oportunidade de me formar em um ambiente altamente renomado em ensino e pesquisa.

Agradeço as agências de fomento Capes, Fapesp e CNPq pelo auxílio financeiro durante diversas etapas do projeto. Em especial agradeço à Fapesp pelo apoio da bolsa de estudo.

"Quando você deseja algo, todo o universo conspira para que você realize seu desejo. A verdadeira felicidade vem da jornada em busca dos seus sonhos, e acreditar que você é capaz é o primeiro passo para alcançá-los."

Paulo Coelho

Índice

Capítulo 1. Introdução

O espermatozoide.....	19
Processos pós-testiculares de maturação espermática.....	23
O papel do epidídimo na maturação espermática.....	24
A importância da capacitação espermática para a fertilização.....	31
Eventos funcionais associados à capacitação espermática.....	31
Aspectos moleculares da capacitação espermática.....	34
Impacto das interações entre proteínas seminais e espermáticas na motilidade e capacitação espermática: uma abordagem para o desenvolvimento de contraceptivos masculinos.....	40
References.....	43

Objetivos

Objetivo geral.....	59
Objetivos específicos.....	59

Capítulo 2. Mouse SEMG1 impairs sperm hyperactivation by inhibiting CatSper: roles of EPPIN binding

Introduction.....	62
Results.....	63
Discussion.....	70
Experimental Procedures.....	73
References.....	75
Supplementary Material.....	80

Capítulo 3. Impacto da SEMG1 em vias de sinalização associadas à capacitação: efeitos sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} e potencial de membrana do espermatozoide

Introdução.....	94
Materiais e métodos.....	95
Resultados.....	97

Discussão.....100

Referências.....104

Conclusão.....110

Anexos.....112

Resumo

Resumo

A EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*) é um alvo farmacológico para contracepção masculina, devido ao seu papel crítico na função do espermatozoide. A EPPIN é expressa pelas células testiculares e epididimárias, e está presente na superfície dos espermatozoides humanos, onde atua inibindo a motilidade espermática após a ejaculação via interação com a proteína seminal semenogelina-1 (SEMG1). Pouco se conhece, no entanto, sobre os mecanismos pelos quais a EPPIN modula a motilidade espermática, bem como seus papéis adicionais na reprodução. Recentemente, demonstramos um sistema equivalente de interação EPPIN/SEMG1 no espermatozoide murino, o que indica que a EPPIN também tem papel no controle da motilidade espermática nessa espécie. Neste projeto, nosso objetivo foi investigar o papel da EPPIN na função do espermatozoide murino, com ênfase no seu perfil de interação com a SEMG1 e potenciais mecanismos de ação no controle da motilidade espermática. Ensaios de interação proteína-proteína confirmaram a interação entre a EPPIN e SEMG1 murina recombinantes (EPPINm e SEMG1m, sequências inteiras sem o peptídeo sinal), sendo que o fragmento recombinante R98-G375 da SEMG1 (SEMG1m^{R98-G375}) interagiu com a EPPIN de maneira similar à SEMG1m inteira, enquanto os fragmentos Q32-V118 (SEMG1m^{Q32-V118}) e Y221-G375 (SEMG1m^{Y221-G375}) tiveram porcentagem de ligação à EPPINm de somente 20% e 30%, respectivamente. Ensaios de CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) revelaram que a SEMG1m inibiu a motilidade progressiva [$IC_{50} = 13,5 \mu M$ (0,9-194,2); média (95% de intervalo de confiança)], e hiperativada [$IC_{50} = 6,8 \mu M$ (1,4-32,9)] de forma dependente da concentração. Interessantemente, tanto o fragmento SEMG1m^{R98-G375}, que contém o principal domínio de interação com a EPPIN, quanto o SEMG1m^{Q32-V118} inibiram a hiperativação. O efeito inibitório da SEMG1m sobre a hiperativação espermática foi associado à inibição do canal de Ca^{2+} específico do espermatozoide CatSper, conforme demonstrado por ensaios de eletrofisiologia para avaliar a corrente deste canal no espermatozoide murino. Consistentemente com esses achados, ensaios de *Western blot* e imunofluorescência revelaram a presença da EPPIN e SEMG1 nos espermatozoides isolados de diferentes regiões do trato reprodutor feminino após a ejaculação. Observamos colocalização da EPPIN com a SEMG1 na cabeça e flagelo de espermatozoides isolados da vagina e útero, porém em menor grau para os espermatozoides isolados de regiões próximas ao oviduto. Nossos resultados demonstram que a inibição da hiperativação espermática induzida pela SEMG1 está relacionada à inibição do CatSper, um efeito que, embora associado, não depende apenas da sua ligação à EPPIN. A identificação das sequências-chave da SEMG1 necessárias para a sua ligação à EPPIN (R98-S220), e inibição da hiperativação (Q32-S220) via inibição do canal CatSper, pode facilitar o desenvolvimento de novas moléculas capazes de mimetizar os efeitos dessa proteína sobre a função espermática, promovendo inovações significativas na descoberta e desenho de novos fármacos com potencial contraceptivo masculino não-hormonal.

Abstract

Abstract

EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) is a pharmacological target for male contraception due to its critical role in sperm function. EPPIN is expressed by testicular and epididymal cells and is present on the surface of human sperm, where it inhibits sperm motility after ejaculation through interaction with the seminal protein semenogelina-1 (SEMG1). However, little is known about the mechanisms by which EPPIN modulates sperm motility and its additional roles in reproduction. Recently, we demonstrated an equivalent EPPIN/SEMG1 interaction system in mouse sperm, indicating that EPPIN also controls sperm motility in this species. In this project, our objective was to investigate the role of EPPIN in mouse sperm function, focusing on its interaction profile with SEMG1 and potential mechanisms of action in controlling sperm motility. Protein-protein interaction assays confirmed the interaction between recombinant mouse EPPIN and SEMG1 (mEPPIN and mSEMG1; full-length sequences lacking the signal peptide), with the recombinant fragment R98-G375 of SEMG1 (mSEMG1^{R98-G375}) interacting with mEPPIN similarly to the full-length mSEMG1. Conversely, the fragments Q32-V118 (mSEMG1^{Q32-V118}) and Y221-G375 (mSEMG1^{Y221-G375}) showed only 20% and 30% binding to EPPIN, respectively. CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) assays revealed that SEMG1m inhibited progressive motility [$IC_{50} = 13.5 \mu M$ (0.9-194.2); mean (95% confidence interval)], and hyperactivation [$IC_{50} = 6.8 \mu M$ (1.4-32.9)] in a concentration-dependent manner. Interestingly, the mSEMG1^{R98-G375} fragment, which contains the main EPPIN-binding domain, and mSEMG1^{Q32-V118} inhibited hyperactivated motility but did not affect progressive motility. Their inhibitory effect on sperm hyperactivation was associated with inhibiting the sperm-specific Ca^{2+} channel CatSper, as demonstrated by electrophysiology assays evaluating this channel's current in mouse sperm. Consistent with these findings, *Western blot* assays revealed the presence of EPPIN and SEMG1 in sperm isolated from different regions of the female reproductive tract after ejaculation, but with a lower abundance in sperm isolated from regions near the oviduct. Our results demonstrate that the inhibition of SEMG1-induced sperm hyperactivation relies on CatSper channel inhibition, an effect that depends, albeit not exclusively, on EPPIN binding. The identification of key SEMG1 sequences necessary for EPPIN binding (R98-S220) and hyperactivation inhibition (Q32-S220), via CatSper channel blockade, may facilitate the development of new molecules capable of mimicking the effects of this protein on sperm function, promoting significant innovations in the discovery and design of new drugs with potential non-hormonal male contraceptive properties.

Listas

Lista de figuras

Capítulo 1. Introdução

Figura 1. Representação esquemática da espermatogênese em camundongos.

Figura 2. Representação esquemática da segmentação do espermatozoide humano.

Figura 3. Características gerais da cabeça do espermatozoide em formato falciforme (camundongo, rato e hamster) e espatulado (humano, coelho).

Figura 4. Divisão geral do epidídimo nas regiões segmento inicial (SI), cabeça, corpo e cauda.

Figura 5. Redução do tamanho do segmento inicial e dos níveis de MAPK3 em camundongos nocautes para o *Src*.

Figura 6. Sistema lumícrino NELL2/NICOL.

Figura 7. Traçados representativos de espermatozoides com motilidade progressiva, em fase de transição (intermediário) e hiperativado.

Figura 8. Representação esquemática da sinalização molecular associada à capacitação de espermatozoides de mamíferos.

Figura 9. Estrutura do canal iônico CatSper.

Figura 10. Imagem representativa de um ensaio fluorométrico para estudar o potencial de membrana do espermatozoide.

Figura 11. Ativação de canais iônicos no espermatozoide durante a capacitação no trato reprodutor feminino.

Capítulo 2. Mouse SEMG1 impairs sperm hyperactivation by inhibiting CatSper: roles of EPPIN binding

Figure 1. Roles of SEMG1 R98-S220 sequence and EPPIN C-Terminal and in the interaction between the proteins.

Figure 2. Effects of mSEMG1 on mouse sperm motility and kinematic parameters.

Figure 3. Impact of mSEMG1 and its fragments in mouse sperm hyperactivation and $I_{CatSper}$.

Figure 4. Presence of EPPIN and mSEMG1 in mouse spermatozoa during *in vivo* capacitation in the female reproductive tract.

Figure 5. Working model of SEMG1 effects after sperm ejaculation.

Supplementary Figure 1. Primary sequences of recombinant mEPPIN and mSEMG1 used in AlphaScreen, CASA, and sperm patch-clamp experiments.

Supplementary Figure 2. Confirmation of mEPPIN and mSEMG1 constructs expression by Western blot.

Supplementary Figure 3. Concentration-response curve for the interaction between hSEMG1 and mEPPIN.

Supplementary Figure 4. Interaction between mEPPIN and mSEMG1 in the presence of anti-EPPIN antibodies.

Supplementary Figure 5. Motility patterns of mouse spermatozoa incubated with increasing concentrations of mSEMG1 at different capacitation times.

Supplementary Figure 6. Viability of mouse spermatozoa incubated with mSEMG1 and its fragments.

Supplementary Figure 7. Effects of mSEMG1 and its fragments on sperm hyperactivation.

Supplementary Figure 8. Effects of mSEMG1 and its fragments on mouse $I_{CatSper}$.

Supplementary Figure 9. Control experiments for $I_{CatSper}$ recordings in sperm collected from the cauda epididymis of mice.

Supplementary Figure 10. Long-lasting effects of SEMG1 fragments on mouse $I_{CatSper}$ after sperm washing.

Capítulo 3. Impacto da SEMG1 em vias de sinalização associadas à capacitação: efeitos sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} e potencial de membrana do espermatozoide

Figura 1. Efeito da mSEMG1 e seus fragmentos sobre os níveis intracelulares de Ca^{2+} de espermatozoides de camundongos.

Figura 2. Efeito da SEMG1m e seus fragmentos sobre o potencial de membrana de espermatozoides de camundongos.

Capítulo 4. Advances in non-hormonal male contraception targeting sperm motility

Figure 1. Schematic representation of sperm-based male contraceptive drug targets regulating sperm motility and currently under preclinical investigation.

Figure 2. Venn diagrams summarizing the properties of potential drug targets considering the quadrant of milestones for sperm-directed male contraceptive drug development.

Figure 3. Male contraceptive drug development targeting the sperm-specific protein phosphatase 1 gamma 2 (PP1c2) isoform.

Supplementary Figure S1. The quadrant of milestones for sperm-directed male contraceptive development.

Lista de tabelas

Capítulo 2. Advances in non-hormonal male contraception targeting sperm motility

Table I. Ligands and their reproductive effects on male contraceptive targets

Supplementary Table SI. Profile of each target according to the quadrant of milestones for sperm-directed male contraceptive development

Capítulo 3. Mouse SEMG1 impairs sperm hyperactivation by inhibiting CatSper: roles of EPPIN binding

Supplementary table 1. High-Saline (HS) Solution

Supplementary table 2. CsMeSO₃ pipette solution

Supplementary table 3. CsMeSO₃ bath solution (Divalent Free bath solution: DVF)

Supplementary Table 4. Predicted cholesterol binding domains in amino acid sequences of human and mouse SEMG1.

Capítulo 1

Introdução

1. O espermatozoide

O espermatozoide é uma célula flagelada com características estruturais e funcionais especializadas. Em espécies com fertilização interna, o espermatozoide é a única célula que deixa o organismo onde é produzida para entregar seu material genético e diferentes tipos de RNAs, incluindo RNAs não codificantes, a outro organismo durante o processo de fertilização (Freitas et al., 2017; Le Blévec et al., 2020; Santiago et al., 2022). A primeira observação dos espermatozoides ocorreu em 1637, realizada por Antonie van Leeuwenhoek, um comerciante, cientista e construtor de microscópios holandês. Ele analisou espermatozoides do próprio sêmen e notou que as células eram móveis e compostas por uma cabeça e um flagelo. Essas observações também foram confirmadas pelo microscopista Nicolaas Hartsoeker, que as documentou em 1694 (Toshimori & Eddy, 2015).

O espermatozoide é o produto final da espermatogênese após sucessivos processos de mitose, meiose e eventos pós-meióticos que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos (Toshimori & Eddy, 2015). A espermatogênese é orquestrada por uma intrincada rede de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, dentre os quais os androgênios (testosterona e diidrotestosterona) destacam-se por serem reguladores fundamentais nesse processo (O'Donnell et al., 2006). A espermatogênese é um processo que compreende estágios celulares sucessivos, transformando espermatogônias (células diploides; $2n$) em espermatídes (células haploides; n), seguida de uma fase de diferenciação celular para a geração dos espermatozoides (Figura 1) (Valli et al., 2015; Larose et al., 2019).

Resumidamente, as espermatogônias têm origem a partir da diferenciação das células germinativas primordiais nos testículos na embriogênese inicial. Durante o período de maturação sexual (camundongos: 10-16 semanas (Hoffmann, 2018); humanos: 9-14 anos (Breehl & Caban, 2024)), as espermatogônias se proliferam por meio de divisões mitóticas, gerando novas espermatogônias (Larose et al., 2019). As espermatogônias podem ser diferenciadas por dois tipos de células: i) espermatogônias do tipo A: células que retêm a capacidade de continuar sofrendo mitose e mantendo a população de células que podem originar novas espermatogônias; e ii) espermatogônias do tipo B: células que possuem características citoplasmáticas e nucleares, adquiridas após um número limitado de divisões mitóticas, e que são necessárias para entrar no ciclo da meiose (Larose et al., 2019).

As espermatogônias do tipo B são as células precursoras diretas dos espermatócitos primários (Larose et al., 2019). A espermatogônia se divide por mitose, originando o espermatócito primário, caracterizado por volume citoplasmático maior em relação às suas células precursoras (Larose et al., 2019). Em seguida, cada espermatócito primário sofre a primeira divisão meiótica, conhecida como reducional, e forma dois espermatócitos

- International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), Artigo 5–6.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072555ea>
- Arifuzzaman, S., Rahman, M. S., & Pang, M.-G. (2019). Research update and opportunity of non-hormonal male contraception: Histone demethylase KDM5B-based targeting. *Pharmacological Research*, 141, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.003>
- Aumüller, G., & Riva, A. (1992). Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*, 24(4), 183–196. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1992.tb02636.x>
- Austin, C. R. (1952). The ‘Capacitation’ of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170(4321), 326–326. <https://doi.org/10.1038/170326a0>
- Avellar, M. C. W., & Hinton, B. T. (2019). Epididymis. Em I. Huhtaniemi & L. Martini (Orgs.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)* (p. 807–813). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65180-2>
- Balestrini, P. A., Jabłoński, M., Schiavi-Ehrenhaus, L. J., Marín-Briggiler, C. I., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2020). Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12), 1188–1198. <https://doi.org/10.1002/mrd.23431>
- Bedford, J. M. (1966). Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *Journal of Experimental Zoology*, 163(3), 319–329. <https://doi.org/10.1002/jez.1401630310>
- Bejarano, I., Espino, J., Paredes, S. D., Ortiz, Á., Lozano, G., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., Bejarano, I., Espino, J., Paredes, S. D., Ortiz, Á., Lozano, G., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2012). Apoptosis, ROS and Calcium Signaling in Human Spermatozoa: Relationship to Infertility. Em *Male Infertility*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32617>
- Berger, T. K., Fußhöller, D. M., Goodwin, N., Bönigk, W., Müller, A., Dokani Khesroshahi, N., Brenker, C., Wachten, D., Krause, E., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2017). Post-translational cleavage of HV1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *The Journal of Physiology*, 595(5), 1533–1546. <https://doi.org/10.1113/JP273189>
- Breehl, L., & Caban, O. (2024). Physiology, Puberty. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534827/>
- Breitbart, H. (2002). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1–2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00085-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00085-7)

- Breton, S., Nair, A. V., & Battistone, M. A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: Role in the maturation, protection and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7(5), 631–643. <https://doi.org/10.1111/andr.12632>
- Brown, S. G., Miller, M. R., Lishko, P. V., Lester, D. H., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., & Martins Da Silva, S. (2018). Homozygous in-frame deletion in CATSPERE in a man producing spermatozoa with loss of CatSper function and compromised fertilizing capacity. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(10), 1812–1816. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey278>
- Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdushev, T., Aghajanian, H. K., & Gerton, G. L. (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular Reproduction and Development*, 79(1), 4–18. <https://doi.org/10.1002/mrd.21393>
- Cancel, A. M., Lobdell, D., Mendola, P., & Perreault, S. D. (2000). Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis*. *Human Reproduction*, 15(6), 1322–1328. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.6.1322>
- Carlson, A. E., Burnett, L. A., Camino, D. del, Quill, T. A., Hille, B., Chong, J. A., Moran, M. M., & Babcock, D. F. (2009). Pharmacological Targeting of Native CatSper Channels Reveals a Required Role in Maintenance of Sperm Hyperactivation. *PLoS ONE*, 4(8), e6844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006844>
- Carrell, D. T. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*, 97(2), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168(4277), 697–698. <https://doi.org/10.1038/168697b0>
- Clapham, D. E., & Hulse, R. E. (2021). Sperm CatSper ion channel swims into sharper focus. *Nature*, 595(7869), 654–655. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01945-5>
- Clauss, A., Lilja, H., & Lundwall, A. (2005). The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.125>
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52(1), 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Curry, P. T., & Atherton, R. W. (1990). Seminal vesicles: Development, secretory products, and fertility. *Archives of Andrology*, 25(2), 107–113. <https://doi.org/10.3109/01485019008987601>

- Domeniconi, R. F., Souza, A. C. F., Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biology of Reproduction*, 95(1), 10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138768>
- Fan, X., & Robaire, B. (1998). Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*, 139(4), 2128–2136. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5888>
- Fardilha, M., Esteves, S. L. C., Korrodi-Gregório, L., Pelech, S., da Cruz E Silva, O. A. B., & da Cruz E Silva, E. (2011). Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 17(8), 466–477. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar004>
- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility†. *Biology of Reproduction*, 96(1), 2–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/andr.12320>
- Girardet, L., Augière, C., Asselin, M.-P., & Belleannée, C. (2019). Primary cilia: Biosensors of the male reproductive tract. *Andrology*, 7(5), 588–602. <https://doi.org/10.1111/andr.12650>
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Hamano, K., Kawanishi, T., Mizuno, A., Suzuki, M., & Takagi, Y. (2016). Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 4 in mouse sperm thermotaxis. *The Journal of Reproduction and Development*, 62(4), 415. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-106>
- Hamzeh, M., & Robaire, B. (2010). Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. *Endocrinology*, 151(9), 4504–4514. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0023>
- Hernández-González, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I., Wertheimer, E., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-

- associated hyperpolarization in mouse sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5623–5633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508172200>
- Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C., & Lye, R. J. (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 53, 47–57.
- Hoffmann, H. M. (2018). Determination of Reproductive Competence by Confirming Pubertal Onset and Performing a Fertility Assay in Mice and Rats. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 140, 58352. <https://doi.org/10.3791/58352>
- Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 956. <https://doi.org/10.1172/JCI41303>
- Hunter, R. H. (1981). Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 63(1), 109–117. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630109>
- Hunter, R. H., & Nichol, R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: Preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *The Journal of Experimental Zoology*, 228(1), 121–128. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280113>
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434(7030), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature03362>
- Jelinsky, S. A., Turner, T. T., Bang, H. J., Finger, J. N., Solarz, M. K., Wilson, E., Brown, E. L., Kopf, G. S., & Johnston, D. S. (2007). The rat epididymal transcriptome: Comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of Reproduction*, 76(4), 561–570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057323>
- Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., & Turner, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of Reproduction*, 73(3), 404–413. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039719>
- Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(4), 536–551. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>
- Kang, H., Liu, M., Zhang, W., Huang, R.-Z., Zhao, N., Chen, C., & Zeng, X.-H. (2021). Na⁺/H⁺ Exchangers Involve in Regulating the pH-Sensitive Ion Channels in Mouse Sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1612. <https://doi.org/10.3390/ijms22041612>
- Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, T., Ohnami, N., Makino, M., Kanai, S., Hasuwa, H., Yoshida, M., Miyado, K., & Umezawa, A. (2014). 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*, 111(11), 4145–4150.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1320715111>
- Kawano, N., & Yoshida, M. (2007). Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biology of Reproduction*, 76(3), 353–361.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056887>
- Kim, K.-S., & Gerton, G. L. (2003). Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental Biology*, 264(1), 141–152.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.08.006>
- Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Molecular Human Reproduction*, 17(8), 478–499.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gar044>
- Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature*, 439(7077), 737–740.
<https://doi.org/10.1038/nature04417>
- Kiyozumi, D. (2023). Lumicrine signaling: Extracellular regulation of sperm maturation in the male reproductive tract lumen. *Genes to Cells*, 28(11), 757–763.
<https://doi.org/10.1111/gtc.13066>
- Kiyozumi, D., Noda, T., Yamaguchi, R., Tobita, T., Matsumura, T., Shimada, K., Kodani, M., Kohda, T., Fujihara, Y., Ozawa, M., Yu, Z., Miklossy, G., Bohren, K. M., Horie, M., Okabe, M., Matzuk, M. M., & Ikawa, M. (2020). NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6495), 1132–1135. <https://doi.org/10.1126/science.aay5134>
- Kiyozumi, D., Shimada, K., Chalick, M., Emori, C., Kodani, M., Oura, S., Noda, T., Endo, T., Matzuk, M. M., Wreschner, D. H., & Ikawa, M. (2023). A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility. *Nature Communications*, 14(1), 2354. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37984-x>
- Kölle, S. (2022). Sperm-oviduct interactions: Key factors for sperm survival and maintenance of sperm fertilizing capacity. *Andrology*, 10(5), 837. <https://doi.org/10.1111/andr.13179>
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr Phosphatases Induces Capacitation-associated Signaling in the Presence of Src Kinase Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 7977–7985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085845>
- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A Journey from Inception to Conception. *Current topics in developmental biology*, 132, 257–310. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.006>

- Le Blévec, E., Muroňová, J., Ray, P. F., & Arnoult, C. (2020). Paternal epigenetics: Mammalian sperm provide much more than DNA at fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110964. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110964>
- Leir, S.-H., Yin, S., Kerschner, J. L., Cosme, W., & Harris, A. (2020). An atlas of human proximal epididymis reveals cell-specific functions and distinct roles for CFTR. *Life Science Alliance*, 3(11). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000744>
- Lin, S., Ke, M., Zhang, Y., Yan, Z., & Wu, J. (2021). Structure of a mammalian sperm cation channel complex. *Nature*, 595(7869), 746–750. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03742-6>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A., & Kirichok, Y. (2010). Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell*, 140(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.053>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Lishko, P. V., & Mannowetz, N. (2018). CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. *Current opinion in physiology*, 2, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.02.004>
- Lyon, M., Li, P., Ferreira, J. J., Lazarenko, R. M., Kharade, S. V., Kramer, M., McClenahan, S. J., Days, E., Bauer, J. A., Spitznagel, B. D., Weaver, C. D., Borrego Alvarez, A., Puga Molina, L. C., Lybaert, P., Khambekar, S., Liu, A., Lindsley, C. W., Denton, J., & Santi, C. M. (2023). A selective inhibitor of the sperm-specific potassium channel SLO3 impairs human sperm function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(4), e2212338120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212338120>
- Mangels, R., Young, B., Keeble, S., Ardekani, R., Meslin, C., Ferreira, Z., Clark, N. L., Good, J. M., & Dean, M. D. (2015). Genetic and phenotypic influences on copulatory plug survival in mice. *Heredity*, 115(6), 496–502. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.50>
- Mariani, N. A. P., Camara, A. C., Silva, A. A. S., Raimundo, T. R. F., Andrade, J. J., Andrade, A. D., Rossini, B. C., Marino, C. L., Kushima, H., Santos, L. D., & Silva, E. J. R. (2020). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 506, 110754. <https://doi.org/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. *Human Reproduction Update*, 29(5), 545–569. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad008>

- Martins, A. D., Bernardino, R. L., Neuhaus-Oliveira, A., Sousa, M., Sá, R., Alves, M. G., & Oliveira, P. F. (2014). Physiology of Na^+/H^+ exchangers in the male reproductive tract: Relevance for male fertility. *Biology of Reproduction*, 91(1), 11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118331>
- McCrudden, M. T. C., Dafforn, T. R., Houston, D. F., Turkington, P. T., & Timson, D. J. (2008). Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. *The FEBS Journal*, 275(8), 1742–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06333.x>
- McKay, A. C., Odeluga, N., Jiang, J., & Sharma, S. (2024). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Seminal Vesicle. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499854/>
- Mendes, F. R., Hamamura, M., Queiróz, D. B. C., Porto, C. S., & Avellar, M. C. W. (2004). Effects of androgen manipulation on $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. *Life Sciences*, 75(12), 1449–1463. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.011>
- Michaut, M., Tomes, C. N., Blas, G. D., Yunes, R., & Mayorga, L. S. (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 9996. <https://doi.org/10.1073/pnas.180206197>
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aad6887>
- Mitra, A., Richardson, R. T., & O’Rand, M. G. (2010). Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biology of Reproduction*, 82(3), 489–496. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081331>
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., De Rooij, D. G., & Vicini, E. (2013). Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. *Biology of Reproduction*, 89(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111682>
- Mundt, N., Spehr, M., & Lishko, P. V. (2018). TRPV4 is the temperature-sensitive ion channel of human sperm. *eLife*, 7, e35853. <https://doi.org/10.7554/eLife.35853>
- Nahed, R. A., Martinez, G., Escoffier, J., Yassine, S., Karaouzène, T., Hograindleur, J.-P., Turk, J., Kokotos, G., Ray, P. F., Bottari, S., Lambeau, G., Hennebicq, S., & Arnoult, C. (2015). Progesterone-induced Acrosome Exocytosis Requires Sequential Involvement of Calcium-independent Phospholipase A2 β (iPLA2 β) and Group X

- Secreted Phospholipase A2 (sPLA2). *The Journal of Biological Chemistry*, 291(6), 3076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677799>
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in Sperm Physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), 1149–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.100>
- Oakberg, E. F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*, 99(3), 507–516. <https://doi.org/10.1002/aja.1000990307>
- O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., & McLachlan, R. I. (2006). CHAPTER 21—Endocrine Regulation of Spermatogenesis. Em J. D. Neill (Org.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (p. 1017–1069). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50026-9>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195953>
- O'Rand, M. G., & Widgren, E. E. (2012). Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. *Biology of Reproduction*, 86(2), 55. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094227>
- O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Beyler, S., & Richardson, R. T. (2009). Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: Effect on cyclic adenosine monophosphate. *Biology of Reproduction*, 80(2), 279–285. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072942>
- O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Hamil, K. G., Silva, E. J., & Richardson, R. T. (2011). Functional studies of eppin. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1447–1449. <https://doi.org/10.1042/BST0391447>
- O'rand, M. G., Widgren, E. E., Sivashanmugam, P., Richardson, R. T., Hall, S. H., French, F. S., VandeVoort, C. A., Ramachandra, S. G., Ramesh, V., & Jagannadha Rao, A. (2004). Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5699), 1189–1190. <https://doi.org/10.1126/science.1099743>
- Orgebin-Crist, M. C. (1967). Sperm Maturation in Rabbit Epididymis. *Nature*, 216(5117), 816–818. <https://doi.org/10.1038/216816a0>
- Pablo, J. L., DeCaen, P. G., & Clapham, D. E. (2017). Progress in ciliary ion channel physiology. *The Journal of General Physiology*, 149(1), 37–47. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611696>
- Patrão, M. T. C. C., Silva, E. J. R., & Avellar, M. C. W. (2009). Androgens and the male reproductive tract: An overview of classical roles and current perspectives. *Arquivos*

- Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*, 53(8), 934–945.
<https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000800006>
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(00)01072-8)
- Peitz, B., & Olds-Clarke, P. (1986). Effects of Seminal Vesicle Removal on Fertility and Uterine Sperm Motility in the House Mouse1. *Biology of Reproduction*, 35(3), 608–617. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.608>
- Pleuger, C., Silva, E. J. R., Pilatz, A., Bhushan, S., & Meinhardt, A. (2020). Differential Immune Response to Infection and Acute Inflammation Along the Epididymis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599594>
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603–609. <https://doi.org/10.1038/35098027>
- Ribeiro, C. M., Silva, E. J. R., Hinton, B. T., & Avellar, M. C. W. (2016). β -defensins and the epididymis: Contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 323–328. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.168791>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00462-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00462-0)
- Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C., & Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, 154, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.004>
- Robaire, B. (1979). Effects of unilateral orchidectomy on rat epididymal delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(9), 998–1003. <https://doi.org/10.1139/y79-149>
- Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 592–599. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014266>
- Robaire, B., & Hinton, B. T. (2015). Chapter 17—The Epididymis. Em T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Orgs.), *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (p. 691–771). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00017-X>
- Robert, M., & Gagnon, C. (1999). Semenogelin I: A coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(6–7), 944–960. <https://doi.org/10.1007/s000180050346>

- Roosen-Runge, E. C. (1962). The Process of Spermatogenesis in Mammals. *Biological Reviews*, 37(3), 343–376. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1962.tb01616.x>
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. (1993). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*, 16(1), 83–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>
- Santi, C. M., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., & Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Letters*, 584(5), 1041–1046. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.005>
- Santiago, J., Silva, J. V., Howl, J., Santos, M. A. S., & Fardilha, M. (2022). All you need to know about sperm RNAs. *Human Reproduction Update*, 28(1), 67–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab034>
- 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. *Molecular Human Reproduction*, 27(12), gaab066. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082014>
- Silva, E. J. R., Hamil, K. G., Richardson, R. T., & O’Rand, M. G. (2012). Characterization of EPPIN’s Semenogelin I Binding Site: A Contraceptive Drug Target. *Biology of Reproduction*, 87(3), 56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101832>
- Silva, E. J. R., Patrão, M. T. C. C., Tsuruta, J. K., O’Rand, M. G., & Avellar, M. C. W. (2012a). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 79(12), 832–842. <https://doi.org/10.1002/mrd.22119>
- Silva, E. J. R., Patrão, M. T. C. C., Tsuruta, J. K., O’Rand, M. G., & Avellar, M. C. W. (2012b). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 79(12), 832–842. <https://doi.org/10.1002/mrd.22119>
- Silva, E. J. R., Vendramini, V., Restelli, A., Bertolla, R. P., Kempinas, W. G., & Avellar, M. C. W. (2014). Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: Insights into the adrenal control of male reproduction. *Andrology*, 2(6), 835–846. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00228.x>

- Simanainen, U., McNamara, K., Davey, R. A., Zajac, J. D., & Handelsman, D. J. (2008). Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology*, 149(7), 3330–3338. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1805>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00608-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00608-5)
- Sosnik, J., Miranda, P. V., Spiridonov, N. A., Yoon, S.-Y., Fissore, R. A., Johnson, G. R., & Visconti, P. E. (2009). Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 15), 2741–2749. <https://doi.org/10.1242/jcs.047225>
- Stark, K., Bylund, J., Törmä, H., Sahlén, G., & Oliw, E. H. (2005). On the mechanism of biosynthesis of 19-hydroxyprostaglandins of human seminal fluid and expression of cyclooxygenase-2, PGH 19-hydroxylase (CYP4F8) and microsomal PGE synthase-1 in seminal vesicles and vas deferens. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 75(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.09.014>
- Stauss, C. R., Votta, T. J., & Suarez, S. S. (1995). Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona Pellucida1. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1280–1285. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1280>
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338), 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature09769>
- Suarez, S. S. (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: Observations in situ. *Biology of Reproduction*, 36(1), 203–210. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.1.203>
- Suarez, S. S., & Dai, X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction*, 46(4), 686–691. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.4.686>
- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B., & Powell, R. L. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of Reproduction*, 44(2), 375–381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.2.375>
- Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., & Soulet, D. (2019). Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*, 7(5), 748–757. <https://doi.org/10.1111/andr.12633>
- Sullivan, R., & Miesusset, R. (2016). The human epididymis: Its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>

- Suryavathi, V., Panneerdoss, S., Wolkowicz, M. J., Shetty, J., Sherman, N. E., Flickinger, C. J., & Herr, J. C. (2015). Dynamic Changes in Equatorial Segment Protein 1 (SPESP1) Glycosylation During Mouse Spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 92(5), 129. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121095>
- Takano, H., Yanagimachi, R., & Urch, U. A. (1993). Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: Inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote (Cambridge, England)*, 1(1), 79–91. <https://doi.org/10.1017/s0967199400001325>
- Toshimori, K., & Eddy, E. M. (2015). Chapter 3—The Spermatozoon. Em T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Orgs.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (p. 99–148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00003-X>
- Turner, T. T., Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Tomsig, J. L., & Finger, J. N. (2007). Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 565–573. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00302.x>
- Turner, T. T., & Riley, T. A. (1999). P53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Molecular Reproduction and Development*, 53(2), 188–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<188::AID-MRD8>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<188::AID-MRD8>3.0.CO;2-O)
- Valli, H., Phillips, B. T., Orwig, K. E., Gassei, K., & Nagano, M. C. (2015). Chapter 15—Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. Em T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Orgs.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (p. 595–635). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00015-6>
- Viger, R. S., & Robaire, B. (1992). Expression of 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology*, 131(3), 1534–1540. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505481>
- Vijayaraghavan, S., Stephens, D. T., Trautman, K., Smith, G. D., Khatra, B., da Cruz e Silva, E. F., & Greengard, P. (1996). Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biology of Reproduction*, 54(3), 709–718. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.709>
- Vinay, L., Hess, R. A., & Belleannée, C. (2024). Human efferent ductules and epididymis display unique cell lineages with motile and primary cilia. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13732>

- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 395–405. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., & Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1–2), 133–150. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00103-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00103-6)
- Vyklicka, L., & Lishko, P. V. (2020). Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. *Current opinion in cell biology*, 63, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.015>
- Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. A., McLeroy, P., Moe, O. W., & Garbers, D. L. (2007). A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9325–9330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611296104>
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K., & Garbers, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1117–1122. <https://doi.org/10.1038/ncb1072>
- Wang, H., McGoldrick, L. L., & Chung, J.-J. (2021). Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nature Reviews. Urology*, 18(1), 46–66. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00390-9>
- Wang, Z., Widgren, E. E., Richardson, R. T., & O’Rand, M. G. (2007). Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 77(3), 476–484. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060194>
- Wang, Z., Widgren, E. E., Sivashanmugam, P., O’Rand, M. G., & Richardson, R. T. (2005). Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 72(5), 1064–1070. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036483>
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., & Babcock, D. F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21210–21217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002068200>
- Xia, J., & Ren, D. (2009). The BSA-induced Ca(2+) influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-119>
- Xu, B., Abdel-Fattah, R., Yang, L., Crenshaw, S. A., Black, M. B., & Hinton, B. T. (2011). Testicular Lumicrine Factors Regulate ERK, STAT, and NFκB Pathways in the Initial

- Segment of the Rat Epididymis to Prevent Apoptosis¹. *Biology of Reproduction*, 84(6), 1282–1291. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090324>
- Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Initial Segment Differentiation Begins During a Critical Window and Is Dependent upon Lumicrine Factors and SRC Proto-Oncogene (SRC) in the Mouse¹. *Biology of Reproduction*, 95(1), 15, 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138388>
- Xu, B., Yang, L., Lye, R. J., & Hinton, B. T. (2010). P-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biology of Reproduction*, 83(5), 807–817. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085613>
- Yanagimachi, R., & Chang, M. C. (1963). FERTILIZATION OF HAMSTER EGGS IN VITRO. *Nature*, 200, 281–282. <https://doi.org/10.1038/200281b0>
- Yenugu, S., Richardson, R. T., Sivashanmugam, P., Wang, Z., O'rand, M. G., French, F. S., & Hall, S. H. (2004). Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1484–1490. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031567>
- Yoda, Y., Yokoyama, M., & Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *The Japanese journal of animal reproduction*, 16(4), 147–151. <https://doi.org/10.1262/jrd1955.16.147>
- Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S. T., Lingle, C. J., & Xia, X.-M. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5879–5884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100240108>