



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

Tamiris Rocha Fanti Raimundo

**Investigação do papel da EPPIN no controle da função espermática:
impacto na capacitação e no potencial fértil de espermatozoides de
camundongos.**

**Botucatu-SP
2021**



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

Tamiris Rocha Fanti Raimundo

**Investigação do papel da EPPIN no controle da função espermática:
impacto na capacitação e no potencial fértil de espermatozoides de
camundongos.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Farmacologia e Biotecnologia do Instituto
de Biociências de Botucatu.

Candidata: Tamiris Rocha Fanti Raimundo

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Tigre
Moura

Botucatu-SP
2021

Auxílio Financeiro

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Processo 2015/08227-0)

Dedico este trabalho aos meus pais, avós e aos meus
irmãos por serem meu alicerce nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar o mestrado e por me dar forças para seguir diante de todas as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Wanessa e Rogério, por todo apoio e incentivo durante os momentos mais difíceis e por sempre acreditarem na minha capacidade, mesmo quando eu mesma não acreditei.

Aos meus avós, Dalva e Israel (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e valores que me moldaram e fazem parte do que sou hoje. Sou grata por ter a oportunidade de tê-los comigo.

Aos meus irmãos, Dérick e Júlia, por todo carinho e por me mostrarem o verdadeiro sentido da vida.

Ao meu namorado Allan por sempre me compreender quando estive ausente. Sou grata por sempre estar disposto a me apoiar e aconselhar nos momentos bons e difíceis.

Agradeço ao meu orientador Erick por todo o aprendizado adquirido durante o mestrado. É muito gratificante encontrar pessoas com tanta paixão pelo que fazem. Sou grata por me fazer crescer no âmbito pessoal e também profissional. Agradeço pela confiança depositada em mim mesmo quando ainda não fazia parte do laboratório, e por me incorporar nessa equipe belíssima que somos.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Marcelo Tigre Moura por todos os ensinamentos, especialmente nos experimentos de fertilização *in vitro*. Sou grata por toda a dedicação no decorrer do projeto e pela paciência em transmitir todo o seu conhecimento.

Aos meus queridos amigos Noemia, Alan, Alexandre, Nathália, Ediléia, Isabela e Gledson por serem minha família enquanto eu estava longe da minha. Agradeço por todos os dias que me fizeram sorrir apesar de todas as dificuldades do dia-a-dia e pelo ombro amigo nos dias de desespero.

Agradeço ao Hélio Kushima por todos os ensinamentos técnicos e por todas as histórias que alegravam nossos dias no laboratório. Também agradeço a Janete, Paulão, Luiz e Cristina pelo carinho de sempre.

Agradeço à prof. Dra. Fabíola e as meninas do laboratório ReproStress da UNIFESP Campus Diadema por todos os ensinamentos e por abrirem as portas do laboratório para realizarmos a pesquisa.

Agradeço ao Mariano Buffone, Martina e Guilhermina por toda colaboração e discussão de resultados.

Agradeço ao IBB/UNESP, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro durante a execução do projeto.

RESUMO

Proteínas do plasma seminal se ligam aos espermatozoides e controlam eventos associados à motilidade e capacitação espermática. Dentre essas proteínas, destacamos a semenogelina-1 (SEMG1), que é a proteína mais abundante do plasma seminal humano e inibe a motilidade progressiva e a capacitação do espermatozoide. A SEMG1 regula a função do espermatozoide ligando-se à proteína EPPIN (do inglês, *Epididymal protease inhibitor protein*), presente na superfície espermática. A demonstração de que ligantes da EPPIN, como anticorpos e moléculas orgânicas de baixo peso molecular mimetizaram os efeitos da SEMG1 na inibição da motilidade espermática tornou a EPPIN um alvo para a contracepção masculina. Visando avançar no entendimento dos aspectos funcionais e moleculares associados ao controle da função espermática pela EPPIN, nosso laboratório vem utilizando o camundongo como modelo experimental. Demonstramos anteriormente que a SVS2 (do inglês, *seminal vesicle secretory protein 2*), ortóloga à SEMG1, é uma proteína de interação da EPPIN em espermatozoides de camundongos, sugerindo que os papéis da EPPIN em eventos relacionados à função espermática são conservados entre camundongos e humanos. Essa hipótese é sustentada por observações de que a SEMG1 humana e a SVS2 murina inibem eventos associados à capacitação espermática, como a reação acrossômica e a hiperativação, via mecanismos ainda pouco conhecidos. Considerando: (i) o efeito inibitório de anticorpos anti-EPPIN miméticos à SEMG1 sobre a motilidade espermática; e (ii) o efeito inibitório da SEMG1 e da SVS2 sobre a capacitação espermática, neste trabalho testamos a hipótese de que anticorpos anti-EPPIN modulam efeitos moleculares e funcionais associados à capacitação espermática. Para isto, induzimos a capacitação de espermatozoides de camundongos na presença e ausência de anticorpos anti-EPPIN (10-300 µg/ml) que reconhecem epítopos específicos na região N-terminal (anticorpos Q20E e F15C) e C-terminal (anticorpo S21C) ou da SVS2 murina recombinante (1-25 µM) e avaliamos os seguintes parâmetros: (i) fosforilação de resíduos de tirosina, serina/treonina e de substratos da proteína quinase A (PKA); (ii) taxa de reação acrossômica espontânea e induzida por ionóforo de cálcio (A23187); e (iii) taxa de fertilização *in vitro* (FIV). Observamos que a incubação com a SVS2r diminuiu a fosforilação de proteínas induzida pela capacitação. Por outro lado, os anticorpos Q20E, F15C e S21C não afetaram o perfil fosfoproteico dos espermatozoides. Com relação à atividade da PKA, que foi avaliada de forma indireta pela abundância dos seus substratos fosforilados, identificamos que o anticorpo S21C, mas não o Q20E, aumentou a atividade da PKA em espermatozoides capacitados. Além disso, os anticorpos S21C e Q20E não modificaram as taxas de reação acrossômica espontânea e induzida (A23187); porém, o anticorpo F15C induziu aumento na taxa de reação acrossômica induzida por A23187. Por fim, observamos que o anticorpo S21C promoveu diminuição das taxas de FIV. Em conjunto, nossas descobertas expandem os caminhos pelas quais a EPPIN deve ser explorada com relação aos seus papéis em eventos moleculares e funcionais do espermatozoide e para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino não hormonal.

Palavras-chaves: espermatozoide; capacitação; contracepção masculina; EPPIN.

ABSTRACT

Seminal plasma proteins bind to spermatozoa and control associated events with sperm motility and capacitation. Among these seminal proteins, we highlight semenogelin-1 (SEMG1), the most abundant protein in the human seminal plasma, inhibits sperm progressive motility and capacitation. SEMG1 regulates sperm function by binding to EPPIN, a protein present on the sperm surface. The demonstration that EPPIN ligands such as antibodies and organic molecules mimicked the effects of SEMG1 in inhibiting sperm motility has lifted EPPIN to the top of the list of male contraceptive drug targets. Aiming to advance the understanding of functional and molecular aspects associated with the control of spermatid function by EPPIN, we have been using the mouse as an experimental model. We have previously demonstrated that SVS2 (seminal vesicle secretory protein 2), the mouse ortholog to SEMG1, is an interacting protein of EPPIN in mouse spermatozoa, suggesting that EPPIN roles in events related to sperm function are conserved between mice and humans. This hypothesis is supported by observations that human SEMG1 and mouse SVS2 inhibit events associated with sperm capacitation, such as acrosome reaction and hyperactivation, via mechanisms that are still poorly understood. Considering: (i) the inhibitory effects of SEMG1 mimetic anti-EPPIN antibodies on sperm motility; and (ii) the inhibitory effect of SEMG1 and SVS2 on sperm capacitation, we tested the hypothesis that anti-EPPIN antibodies modulate molecular and functional effects associated with sperm capacitation. For that, we induced mouse sperm capacitation in the absence or presence of anti-EPPIN (10-300 µg/ml) that recognize specific epitopes in the N-terminal (Q20E and F15C) and C-terminal (S21C) or recombinant murine SVS2 region (1-25 µM) and evaluated the following parameters: (i) phosphorylation of tyrosine, serine/threonine residues, and PKA substrates; (ii) acrosome reaction rates of spontaneous samples and calcium ionophore-induced reaction (A23187); and (iii) in vitro fertilization rates. We observed that the incubation with SVS2r decreased capacitation-induced protein phosphorylation. On the other hand, Q20E, F15C, and S21C did not affect the phosphoprotein profile of spermatozoa. Regarding PKA activity, which was indirectly assessed by the source of its phosphorylated substrates, we found that the S21C antibody, but not Q20E, increased PKA activity in capacitated spermatozoa. Furthermore, S21C and Q20E did not change spontaneous and A23187-induced acrosome reaction rates; however, the F15C antibody increased A23187-induced acrosome reaction. Finally, we observed that spermatozoa incubated with S21C antibody during capacitation showed decreased in vitro fertilization rates. Together, our findings expand the understanding of how EPPIN modulates molecular events associated with sperm function, contributing to its development as a non-hormonal male contraceptive.

Keywords: spermatozoa; capacitation; male contraception; EPPIN.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCY10: adenilato ciclase solúvel

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

AR: acrosome reaction, do inglês

BSA: albumina sérica bovina

CA: anidrase carbonica

CatSpers: canais de cátions dos espermatozoides

Clu: clusterina

EPPIN: Inibidor de protease epididimário

Hv1: voltage-gated proton channel

LTF: lactotransferrina

NHES: *Na⁺/H⁺ exchanger*, do inglês

PKA: protein Kinase A, do inglês

PSA: antígeno prostático específico

REST: Rapid evolving seminal-vesicle-transcribed, do inglês

SEMG1: semenogelina-1

SEMG2: semenogelina-2

SLC: co-transportador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$

SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês

TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

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

SUMÁRIO

Capítulo 1

INTRODUÇÃO.....	03
1. O espermatozoide.....	03
2. Maturação espermática pós-testicular.....	06
2.1. Maturação espermática no epidídimo.....	06
2.2. Capacitação espermática.....	08
2.2.1. Aspectos moleculares da capacitação espermática.....	10
2.2.2. Eventos funcionais associados a capacitação espermática.....	13
3. Controle da Função espermática e dos eventos associados à capacitação.....	18
3.1. A EPPIN como alvo farmacológico para contracepção masculina não hormonal.....	21

Capítulo 2

OBJETIVOS.....	26
1. Objetivo geral.....	26
2. Objetivos específicos.....	26

Capítulo 3

<i>Differential effects of EPPIN ligands on capacitation-associated events in mouse spermatozoa</i>	27
ABSTRACT.....	28
INTRODUCTION.....	28
MATERIAL AND METHODS.....	31
RESULTS.....	37
DISCUSSION.....	49
REFERENCES.....	54
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	73

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. O espermatozoide

Os espermatozoides são células altamente especializadas com características únicas que os tornam capazes de entregar o genoma masculino ao ócito no momento da fertilização (Eddy, 2006; Freitas *et al.*, 2017). Os espermatozoides são o produto final da espermatogênese, caracterizada por uma série de eventos celulares que incluem: (i) a autorrenovação de espermatogônias e produção dos espermatócitos primários por divisões mitóticas, (ii) produção dos espermatócitos secundários a partir dos primários por meiose I; (iii) produção de espermatídes redondas haploides a partir dos espermatócitos secundários por meiose II; (iv) diferenciação das espermatídes redondas em espermatídes alongadas (espermiogênese); (v) liberação dos espermatozoides na luz do túbulo seminífero (espermição) (Chen *et al.*, 2017) (Figura 1). Os espermatozoides liberados na luz dos túbulos seminíferos já são morfologicamente diferenciados, apresentando alta condensação nuclear, transcrição e tradução silenciadas (O'Donnell *et al.*, 2001).

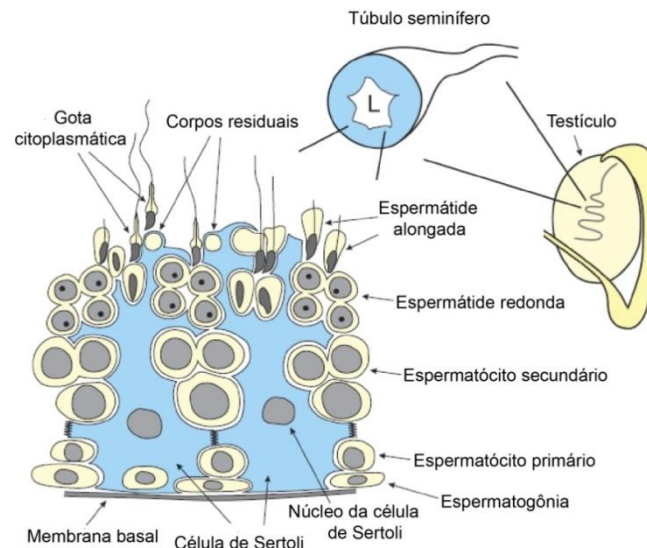


Figura 1. Espermatogênese em mamíferos. A espermatogênese avança da membrana basal ao lúmen do túbulo seminífero com o apoio de células nutritivas essenciais, conhecidas como células de Sertoli. As espermatogônias (células-tronco germinativas) residem no compartimento basal e se proliferam através de divisões mitóticas. As espermatogônias se diferenciam em espermatócitos primários. Os espermatócitos secundários, por sua vez, são formados pela primeira divisão meiótica e posteriormente são convertidos em espermatídes redondas através da segunda divisão meiótica. As espermatídes alongadas são células em processo de espermição sofrendo transformação morfológica do núcleo e do corpo celular. No processo final da espermição, a maior parte do citoplasma é removida (fagocitada pelas células de Sertoli) para formar os espermatozoides morfologicamente maduros. O citoplasma residual é conhecido como gota citoplasmática. Adaptado de Chen *et al.* (2017).

Do ponto de vista estrutural, o espermatozoide de mamíferos contém dois componentes principais: a cabeça e o flagelo, unidos pela peça de conexão. A cabeça é composta pelo núcleo, acrossoma, estruturas do citoesqueleto e citoplasma (Eddy, 2006). Ressalta-se, entretanto, que a morfologia e tamanho da cabeça variam de acordo com a espécie. Por exemplo, a cabeça do espermatozoide de camundongos exibe um formato falciforme, enquanto o de humanos, formato espatular (Figura 2) (Tulsiani, 2003; Eddy, 2006). Independentemente do formato, a superfície da cabeça dos espermatozoides pode ser subdividida em região acrossomal (anterior), composta pelos segmentos marginal, principal e equatorial, e região pós-acrossomal (posterior); esta contempla a região da membrana plasmática que não é coberta pelo acrossoma (Tulsiani, 2003) (Figura 2).

O acrossoma é uma vesícula secretora derivada do complexo de Golgi. Esta vesícula é repleta de enzimas hidrolíticas, incluindo acrosina, proacrosina, hialuronidase, galactosidase, dentre outras que são liberadas no processo de reação acrossômica, provocada por indutores endógenos (p. ex., progesterona ou proteínas da zona pelúcida) ou exógenos (p. ex., ionóforo de cálcio A23187) (Belmonte *et al.*, 2016). A liberação dos conteúdos da matriz acrossomal é crucial para que a célula consiga atravessar as camadas do oócito no sistema genital feminino (Stival *et al.*, 2016). Dessa forma, o acrossoma atua como uma organela essencial durante a fertilização.

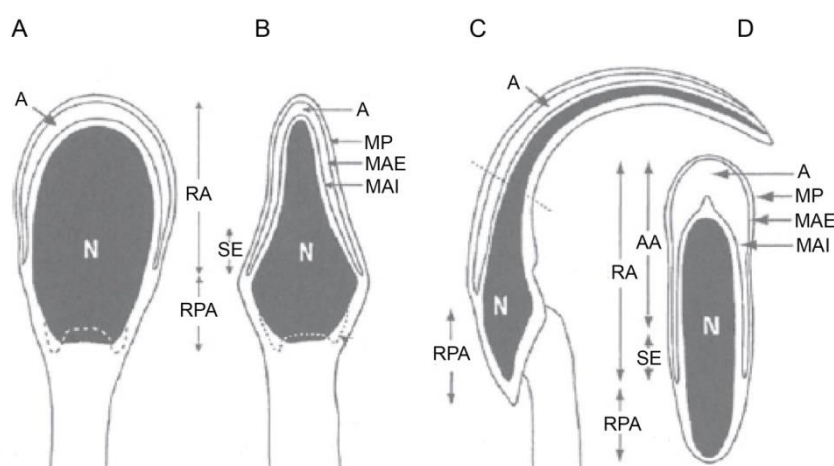


Figura 2. Ilustração esquemática da cabeça do espermatozoide humano (A e B) e do rato (C e D). Em A e C são representadas seções longitudinais, enquanto que em D é demonstrado uma secção sagital (D). As ilustrações B e D correspondem aos níveis do plano das seções visto em A e C. A, acrossoma; AA, acrossoma anterior; RA, região acrossomal; SE, segmento equatorial; MAI, membrana acrossomal interna; N, núcleo; MAE, membrana acrossomal externa; RPA, região pós-acrossomal; MP, membrana plasmática. Adaptado de Tulsiani (2003).

O flagelo dos espermatozoides é subdividido em quatro principais regiões: a peça de conexão, a peça intermediária, a peça principal e a peça final (Figura 3A). O flagelo contém as seguintes estruturas: axonema, bainha mitocondrial, feixe de fibras densas e bainha fibrosa, as quais são distribuídas de maneira diferencial em cada peça. O axonema é composto por um complexo de “9+2” pares de microtúbulos que se estende por todo o flagelo (Figura 3B). Adjacente ao axonema encontra-se o feixe de fibras densas, presente desde a peça de conexão até a porção final da peça principal. A bainha mitocondrial por sua vez, 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) (Figura 3B).

Os espermatozoides morfológicamente maduros produzidos nos testículos requerem a aquisição de propriedades funcionais para se tornarem férteis. Essas competências são adquiridas durante o trânsito no epidídimo e no sistema genital feminino e conferem ao espermatozoide a capacidade de fertilização (Gervasi & Visconti, 2016). Em conjunto, estes eventos são conhecidos como maturação espermática pós-testicular, os quais abordaremos a seguir.

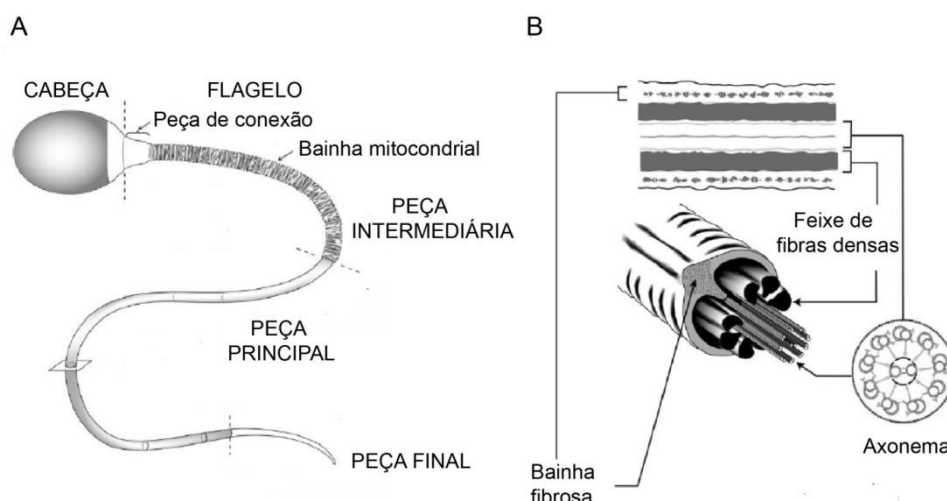


Figura 3. Aspectos morfológicos do espermatozoide humano. (A) Representação dos aspectos gerais do espermatozoide. A cabeça é conectada ao flagelo pela peça de conexão. O flagelo é dividido em peça intermediária, peça principal e peça final. (B) Componentes estruturais do citoesqueleto do flagelo de espermatozoides. O axonema se estende da peça de conexão até extremidade distal do flagelo. Consiste em um conjunto de “9+2” pares de microtúbulos. O feixe de fibras densas externas se estende da peça de conexão até o final da peça principal. A bainha fibrosa envolve o axonema e o feixe de fibras densas externas na região da peça principal do flagelo. Adaptado de Eddy (2006).

2. Maturação espermática pós-testicular

Ao deixarem o testículo, os espermatozoides ainda não adquiriram a capacidade de se locomover progressivamente e de fertilizar os oócitos. A aquisição dessas habilidades e do apogeu funcional dos espermatozoides depende do processo de maturação epididimária, que ocorre no epidídimo e da capacitação, que por sua vez ocorre no sistema genital feminino. Juntos, esses eventos compõem as duas etapas de maturação espermática pós-testicular (Gervasi & Visconti, 2016). A maturação espermática no epidídimo promove modificações cruciais e permite a aquisição de propriedades necessárias para que o espermatozoide seja capaz de se locomover progressivamente e de sofrer o processo de capacitação (Tulsiani, 2003). Este é definido como uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem quando os espermatozoides estão no sistema genital feminino e que os prepara para a fertilização. Esse processo promove dentre outros efeitos: i) modificações pós-traducionais, como a fosforilação de proteínas espermáticas; ii) preparação do espermatozoide para sofrer reação acrossômica; iii) alteração no padrão de motilidade progressiva para hiperativada; iv) interação e fertilização do oócito (Gervasi & Visconti, 2016).

2.1. Maturação espermática no epidídimo

O epidídimo de mamíferos é um ducto convoluto e longo, localizado adjacientemente aos testículos, conectando os dúctulos eferentes ao ducto deferente. Anatomicamente, o epidídimo é dividido em quatro principais segmentos: o segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Robaire & Hinton, 2015) (Figura 4A). Trata-se de um órgão responsável pelo fornecimento de um ambiente ideal para a maturação dos espermatozoides e também para o seu armazenamento em estado quiescente até a ejaculação (Zhou *et al.*, 2018). Além de promover a maturação e armazenamento dos espermatozoides, o epidídimo também os protege durante o trânsito pelo epidídimo contra ameaças químicas e patológicas (Hinton & Avellar, 2018).

O epitélio do epidídimo é composto por diversos tipos celulares como as células principais e células basais, encontradas em todas as suas regiões, além de células identificadas exclusivamente em regiões específicas, como as células estreitas e células apicais, presentes no segmento inicial, e as células claras, encontradas em todas as regiões do epidídimo, exceto

no segmento inicial (Robaire & Hinton, 2015). Diversos tipos de células imunológicas, como células dendríticas e linfócitos diferenciados também estão presentes no epitélio epididimário (Da Silva *et al.*, 2011).

É sabido que a atividade secretora e absorviva das células epiteliais epididimárias é responsável pela formação de um microambiente luminal altamente especializado, que permite o gradiente de maturação crescente nos espermatozoides nas regiões proximais do epidídimo bem como seu armazenamento na região da cauda (Turner, 1984). A maturação espermática é adquirida devido a interações entre fatores secretados pelas células epididimárias e aqueles presentes nos espermatozoides durante o trânsito pelo epidídimo (Robaire & Hinton, 2015). Essas interações promovem modificações na estrutura e fluidez da membrana espermática, aumento nas interações químicas entre os componentes do flagelo, que promove a estabilidade das fibras densas externas, mitocôndrias e bainha fibrosa. Além disso, enzimas metabólicas têm sua atividade alterada durante a maturação epididimária, o que contribui para mudanças na composição dos fosfolipídios da membrana plasmática (Robaire & Hinton, 2015). Esses eventos que acontecem durante a maturação epididimária preparam o espermatozoide para sofrer a capacitação espermática no sistema genital feminino (Abou-haila & Tulsiani, 2009; Gervasi & Visconti, 2017).

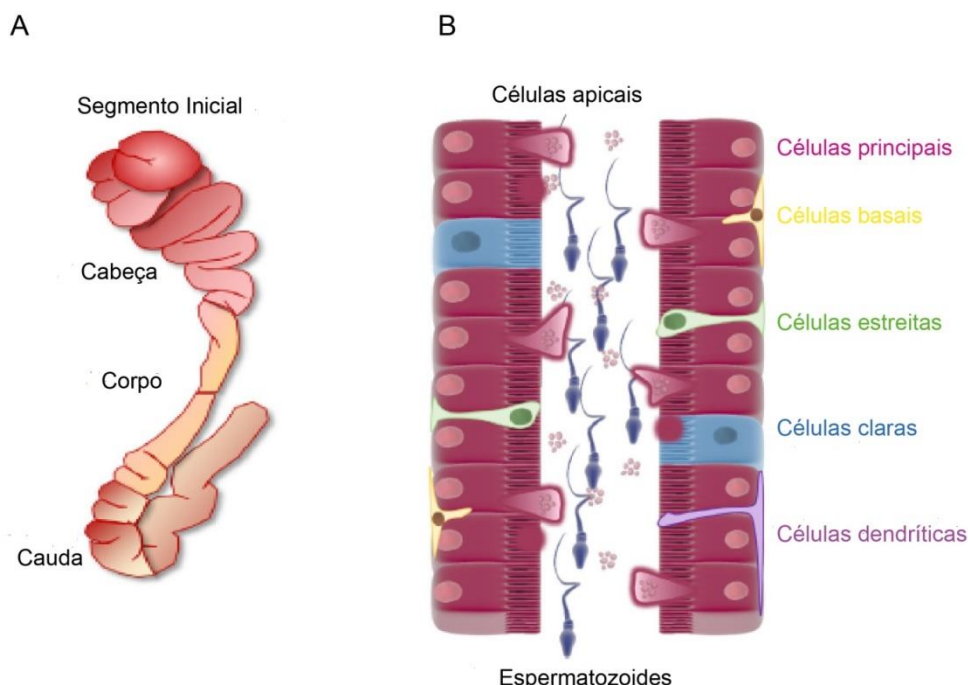


Figura 4. Estrutura do epidídimo regionalizada e distribuição esquemática dos principais tipos celulares encontrados no epidídimo de camundongo. (A, B) O epidídimo de mamíferos é um ducto altamente enovelado, dividido anatomicamente em quatro segmentos principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. O segmento inicial é caracterizado por um ducto pouco enovelado com um diâmetro largo e uma pequena quantidade de espermatozoides. A cabeça tem diâmetro mais estreito do que o segmento inicial, e tanto o diâmetro luminal quanto a quantidade de espermatozoides é crescente em direção à região do corpo e cauda. Nessas regiões distais do epidídimo, há estocagem de espermatozoides até o momento da ejaculação. Diferentes tipos celulares dentro desses segmentos são responsáveis pela criação de um microambiente luminal especializado que promove a maturação sequencial dos espermatozoides na cabeça e corpo do epidídimo; e seu armazenamento subsequente na cauda. As células principais, distribuídas ao longo de todo o epidídimo são responsáveis pela biossíntese e secreção de proteínas nos segmentos proximais do epidídimo. Além dessas células, as células claras são distribuídas esporadicamente por todo o epitélio da cabeça, corpo e cauda do epidídimo e são principalmente ativas na absorção de componentes luminiais e regulam do pH luminal. Outros tipos celulares são identificados no epidídimo, incluindo células basais, células apicais, células estreitas (reportadas apenas no segmento inicial) e células dendríticas. Adaptado de Zhou *et al.* (2018).

2.2. Capacitação espermática

Antes de alcançarem o local de fertilização no oviduto, os espermatozoides devem atravessar a junção útero-tubal (JUT) (Suarez & Pacey, 2006). Durante essa travessia, os espermatozoides são altamente selecionados, devido, pelo menos em parte, à expressão e localização adequada de algumas proteínas espermáticas como, por exemplo, a ADAM3 (Gervasi & Visconti, 2016). Dessa forma, os espermatozoides que conseguem atravessar a JUT alcançam o istmo do oviduto e se ligam ao epitélio ovidutal (Figura 5). Essa ligação ocorre pela interação entre carboidratos presentes no epitélio do istmo e proteínas semelhantes à lectina, identificadas na superfície da cabeça dos espermatozoides (Suarez & Pacey, 2006; Coy *et al.*, 2012). Os espermatozoides ligados ao epitélio ovidutal formam uma reserva

espermática, evento que já foi identificado em diversas espécies, tais como camundongos (Suarez, 1987), humanos (Pacey *et al.*, 1995), suínos (Hunter, 1981) e ovinos (Hunter & Nichol, 1983).

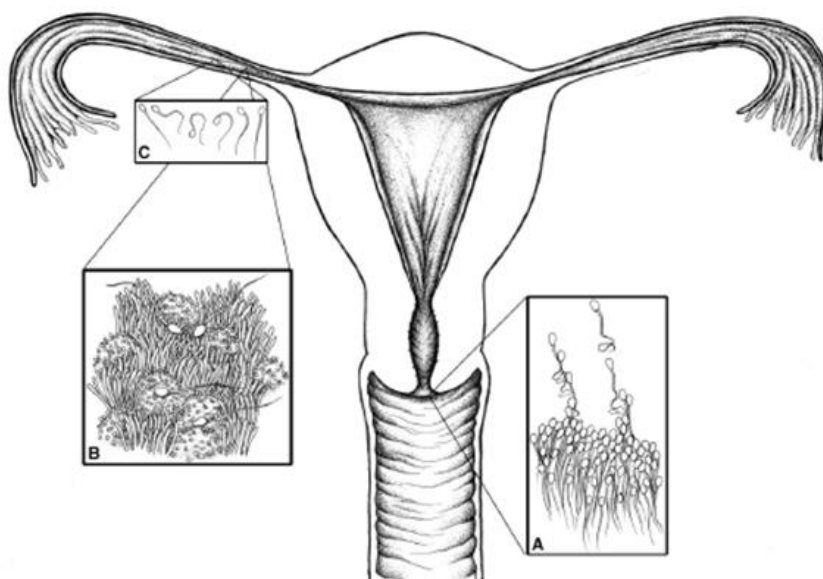


Figura 5. Ilustração do sistema genital feminino humano e dos estágios do transporte dos espermatozoides ejaculados. (A) Os espermatozoides ascendem o útero através do colo do útero e atravessam a junção útero-tubal presente na porção que liga o útero ao oviduto. (B) Espermatozoides interagindo com o epitélio do istmo no oviduto na região posterior a junção útero-tubal, formando a reserva ovidutal espermática até o momento da ovulação. (C) Espermatozoides com motilidade hiperativada adquirida no processo de capacitação. Posteriormente a capacitação, na qual ocorre quando os espermatozoides estão aprisionados no epitélio do oviduto, eles seguem em direção à ampola onde ocorre a fertilização. Adaptado de Suarez & Pacey (2006).

Na reserva ovidutal, os espermatozoides sofrem uma série de mudanças bioquímicas, moleculares e funcionais, coletivamente conhecidas como capacitação espermática. Estudos mostram que este evento está associado à presença de moléculas removedoras do colesterol da membrana espermática, como albumina, responsáveis por alterações do pH do meio, como o ânion bicarbonato (HCO_3^-), dentre outras substâncias presentes de maneira abundante no oviduto (Ehrenwald *et al.*, 1990; Puga Molina *et al.*, 2018). Este evento pode ser mimetizado *in vitro* em meios quimicamente definidos que contenham essencialmente moléculas removedoras de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides (p.ex., albumina sérica bovina; BSA) e bicarbonato de sódio em concentrações definidas (Gervasi & Visconti, 2016). Além disso, o meio capacitante é composto por outros íons, como Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_4^- e metabólitos energéticos, tais como glicose, piruvato e lactato que são necessários para o alto consumo de ATP requerido para a motilidade e outros processos (Gervasi &

Visconti, 2016).

2.2.1. Aspectos moleculares da capacitação espermática

Do ponto de vista molecular, a capacitação é regulada por diferentes vias de sinalização celular que promovem, dentre outros efeitos o aumento dos níveis de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), aumento do pH intracelular ($[pH]_i$) e hiperpolarização da membrana plasmática (Gervasi & Visconti, 2016). Existem semelhanças e diferenças nos mecanismos moleculares responsáveis pelo disparo da capacitação entre o espermatozoide murino e humano (Figura 6).

A capacitação espermática está associada à remoção do colesterol da membrana plasmática pela albumina presente no sistema genital feminino e é desencadeada por um aumento dos níveis intracelulares de HCO_3^- , cuja entrada na célula pode ocorrer de duas maneiras distintas. Uma delas é que o CO_2 pode se difundir através da membrana, sendo então convertido pela anidrase carbônica (CA) em HCO_3^- . Outro possível mecanismo de entrada do HCO_3^- no espermatozoide consiste no seu transporte transmembranar pelo cotransportador Cl^-/HCO_3^- (SLC), presente tanto em espermatozoides humanos quanto murinos (Vyklícka & Lishko, 2020). A alcalinização intracelular também pode ser provocada pela ação do trocador Na^+/H^+ específico do espermatozoide (sNHE) (Vyklícka & Lishko, 2020). Além disso, outro mecanismo eficiente na regulação do $[pH]_i$ é o canal iônico controlado por voltagem (Hv1), identificado apenas no espermatozoide humano (Lishko *et al.*, 2010).

O aumento do $[pH]_i$ é um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da concentração de Ca^{2+} no interior do espermatozoide. A principal estrutura envolvida neste evento é o complexo CatSper. Trata-se de um complexo proteico expresso em células germinativas masculinas e localizado na peça principal do flagelo no espermatozoide maduro composto por diferentes subunidades que se organizam na membrana plasmática do espermatozoide formando um canal permeável ao Ca^{2+} (Lishko *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017). O canal CatSper é o mais complexo canal iônico conhecido, sendo formado por 4 subunidades formadoras do poro (CatSper1-CatSper4), cada uma composta por 6 segmentos transmembranares, dentre os quais os segmentos S1-S4 formam o domínio de detecção de voltagem (VSD) (Lin *et al.*, 2021). Além disso, o complexo CatSper também possui múltiplas subunidades auxiliares

(CatSper β , CatSper γ , CatSper ϵ , CatSper δ , CatSper ζ , EFCAB9, dentre outras), com papéis importantes na estabilização da estrutura e na condução de Ca^{2+} (Vyklícka & Lishko, 2020; Lin *et al.*, 2021). Estudos mostram que camundongos machos nocautes para diferentes subunidades do CatSper, incluindo as quatro que formam o canal e todas as auxiliares citadas anteriormente são inférteis em decorrência de falha no processo de hiperativação (Sun *et al.*, 2017).

A indução fisiológica dos canais CatSper pela progesterona representa um mecanismo importante para sua ativação em espermatozoides humanos (Lishko *et al.*, 2011). Essa ativação ocorre de maneira indireta via sistema endocanabinoide na qual, a progesterona liberada pelo complexo *cumulus oophorus* (COC) ativa a enzima ABHD2 e esta cliva o 2-AG (2-araquidonilglicerol) em ácido aracdônico e, portanto, remove a inibição imposta por 2-AG no canal CatSper, culminando na ativação de Catsper (Figura 6) (Miller *et al.*, 2016; Vyklícka & Lishko, 2020). Outro mecanismo envolvido na regulação de Catsper é por meio da sua subunidade citoplasmática EFCAB9 (Miller *et al.*, 2016). Além disso, a temperatura de 37°C no sistema genital feminino ativa o canal TRPV4 (do inglês, *transient receptor potential cation channel subfamily member 4 vanilloid 4 channel*) permitindo que cátions como Na^+ e Ca^{2+} entrem na célula e causem despolarização da membrana, culminando na abertura do canal de CatSper (Vyklícka & Lishko, 2020). No espermatozoide murino, o principal mecanismo conhecido de abertura dos canais Catsper é através do aumento do $[\text{pH}]_i$ (Vyklícka & Lishko, 2020).

Alterações no potencial da membrana do espermatozoide podem modular a atividade do canal Catsper durante a capacitação. O potencial de membrana dos espermatozoides é regulado pelo gradiente de Na^+/K^+ gerado pela Na^+/K^+ -ATPase A4 (Gervasi & Visconti, 2016; Vyklícka & Lishko, 2020). Esse gradiente pode ser usado para regular a atividade do trocador sNHE, que promove o influxo de Na^+ e o efluxo de H^+ , garantindo a alcalinização do $[\text{pH}]_i$. Dessa forma, o íon potássio entra na célula através da Na^+/K^+ -ATPase A4 e pode sair através do canal SLO3, um canal de K^+ específico do espermatozoide (Navarro *et al.*, 2007). O efluxo de K^+ , por sua vez, causa hiperpolarização da membrana, regulando a atividade de Catsper (Vyklícka & Lishko, 2020).

Juntos, o HCO_3^- e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem desencadear a ativação da ADCY10, que produz o segundo mensageiro AMPc, resultando na ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA por sua vez, promove uma fosforilação em cascata de proteínas espermáticas como serina/treonina, resultando, dentre outros efeitos, na ativação de enzimas tirosina quinases (Salicioni *et al.*, 2007; Alvau *et al.*, 2016; Baro Graf *et al.*, 2020) (Figura 6).

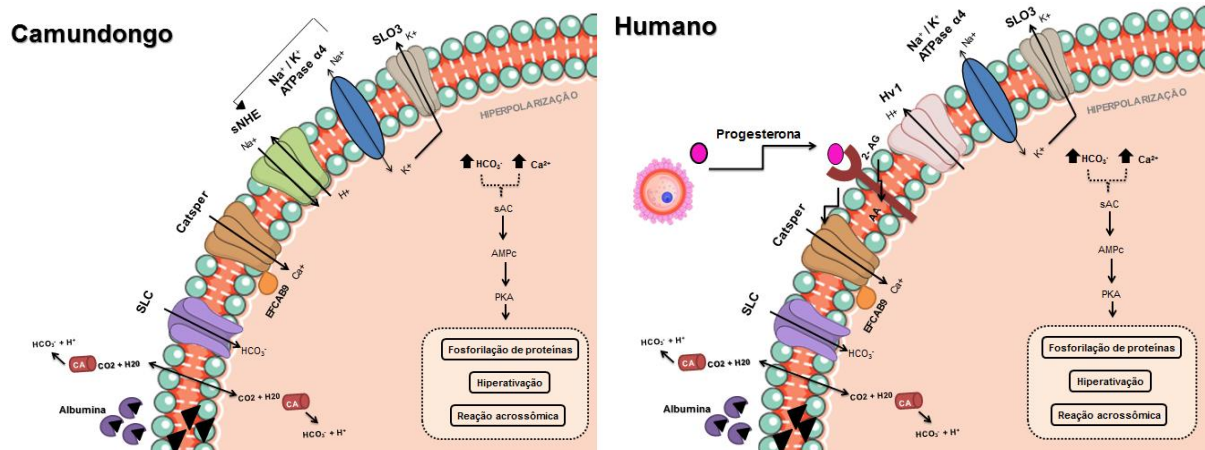


Figura 6. Fluxos de íons durante o processo de capacitação de espermatozoides de mamíferos. No camundongo, a albumina presente no sistema genital feminino ou em condições capacitantes de incubação, remove o colesterol da membrana plasmática que ocorre por um aumento de HCO_3^- intracelular. O bicarbonato pode entrar na célula de maneiras distintas: Uma delas é que o CO_2 pode se difundir através da membrana e então é convertido pelo CA em HCO_3^- . Outro possível mecanismo de entrada do HCO_3^- é que ele pode ser transportado para a célula pelo co-transportador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ (SLC). O aumento do $[\text{pH}]_i$ também pode ser provocado pela atividade de transportadores NHE. A alcalinização permite a abertura de canais CatSper que resultam na entrada de Ca^{2+} na célula. Este canal é regulado adicionalmente por meio de sua subunidade citoplasmática EFCAB9. O gradiente de Na^+ / K^+ através da membrana plasmática e, portanto, o potencial de membrana são regulados pela Na^+ / K^+ -ATPase $\alpha 4$. Esse gradiente regula a atividade do trocador NHE. O efluxo de K^+ promove hiperpolarização da membrana plasmática e também regula atividade de CatSper. Dessa forma, o aumento do pH e dos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativam a ADCY10, aumentando a produção do segundo mensageiro AMPc. Esse mensageiro promove a ativação da PKA (proteína quinase A) e esta por sua vez, promove a fosforilação em cascata de proteínas espermáticas. Já no espermatozoide humano, a progesterona produzida pelas células do cóculo do ooforo (COCs), interage com ABHD2 permitindo a clivagem de 2-AG (do inglês, 2-arachidonoylglycerol) em AA (ácido araquidônico). Esse evento regula positivamente a atividade de CatSper e permite a entrada de Ca^{2+} na célula. O aumento do $[\text{pH}]_i$ pode ser alcançado pelo efluxo de prótons através do Hv1, que é ativado pela anandamida e ácidos graxos liberados pelas COCs. Assim como ocorre no camundongo, durante a capacitação espermática o HCO_3^- entra na célula por difusão do CO_2 e através da conversão por HCO_3^- . Além disso, o HCO_3^- pode ser transportado para dentro da célula pelo cotransportador SLC. Já o íon potássio entra na célula através da Na^+ / K^+ -ATPase $\alpha 4$. A alcalinização e aumento dos níveis de Ca^{2+} ativa a ADCY10 e o aumento da produção do segundo mensageiro ativa a PKA e ocorre aumento na fosforilação de proteínas espermáticas. Coletivamente esses eventos permitem com que a célula altere o padrão de motilidade para hiperativação e prepara a célula para sofrer reação acrossômica. Adaptado de Darszon *et al.* (2011); Vyklicka & Lishko (2020).

Dentre os eventos moleculares associados à capacitação, enfatizaremos a seguir aqueles que promovem alteração no perfil de fosforilação de proteínas. A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional envolvida no controle de eventos celulares. Em células

eucarióticas, a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina, serina e treonina, na qual, o estado de fosforilação é controlado por vias de sinalização celular (Urner & Sakkas, 2003). Alterações na fosforilação de proteínas espermáticas associadas à capacitação foram reportadas em diversas espécies, incluindo camundongo (Visconti *et al.*, 1995a), homem (Leclerc *et al.*, 1996; Osheroff *et al.*, 1999) e bovinos (Galantino-Homer *et al.*, 1997).

A PKA é uma das principais serina/treonina quinases encontradas em espermatozoides humanos e murinos (Baro Graf *et al.*, 2020). No entanto, a PKA não é capaz de fosforilar proteínas diretamente em resíduos de tirosina. Dessa forma, três possíveis mecanismos de interação entre PKA e a fosforilação de tirosina foram propostos: 1) estimulação direta ou indireta de tirosina quinase pela PKA (tirosina quinase SRC); 2) inibição direta ou indireta de uma fosfotirosina fosfatase (membros da família de fosfatases PPP); 3) fosforilação direta ou indireta de proteínas pela PKA em resíduos de serina ou treonina que preparam essas proteínas para fosforilação subsequente por uma tirosina quinase (Visconti *et al.*, 1995b; Leclerc *et al.*, 1996; Tulsiani, 2003; Gervasi & Visconti, 2016). A relevância da PKA para a fertilidade masculina começou a ser desvendada quando espermatozoides de camundongos nocautes para a isoforma específica do espermatozoide da subunidade catalítica alfa da PKA (*Pkaca*^{-/-}) não mostraram aumento na fosforilação de tirosina durante a capacitação (Nolan *et al.*, 2004). De forma consistente, camundongos *Pkaca*^{-/-} são inférteis devido à ausência de eventos associados à capacitação, como motilidade hiperativada e outros defeitos de motilidade espermática (Nolan *et al.*, 2004). Logo, a via de sinalização ADCY10/AMPC/PKA demonstrou ser uma via reguladora central para eventos espermáticos essenciais para a fertilidade masculina (Baro Graf *et al.*, 2020).

2.2.2 Eventos funcionais associados à capacitação espermática

A cascata de sinalização ADCY10/AMPC/PKA em conjunto com as outras vias de sinalização citadas anteriormente culminam em uma série de alterações funcionais no espermatozoide, incluindo seu perfil de motilidade e liberação do conteúdo acrossomal, que são fundamentais para a fertilização (Suarez, 2008; Abou-haila & Tulsiani, 2009; Gervasi & Visconti, 2016).

No oviduto, os espermatozoides adquirem um tipo específico de motilidade, conhecida como motilidade hiperativada (Figura 7). Esta é caracterizada por movimentos flagelares assimétricos e vigorosos (Suarez, 2008). O movimento flagelar característico da motilidade hiperativada permite que os espermatozoides superem o muco denso secretado pelo epitélio ovidutal, desprendendo-se da reserva espermática ovidutal durante a capacitação (Suarez, 2008). Além disso, a hiperativação confere ao espermatozoide a capacidade de penetrar nas camadas protetoras do oócito durante nas primeiras etapas da fertilização (Suarez & Pacey, 2006).

Como descrito anteriormente, a hiperativação depende da ativação de vias de sinalização que culminam em mudanças no $[pH]_i$, aumento da concentração de $[Ca^{2+}]_i$, alterações no potencial de membrana e produção de AMPc nos espermatozoides (Ho & Suarez, 2001; Suarez, 2008). De fato, a iniciação e manutenção da motilidade hiperativada *in vitro* depende da presença de fatores como Ca^{2+} , HCO_3^- e substratos energéticos no meio de cultura (Suarez, 2008). No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela transição da motilidade progressiva para hiperativada ainda não estão totalmente esclarecidos.

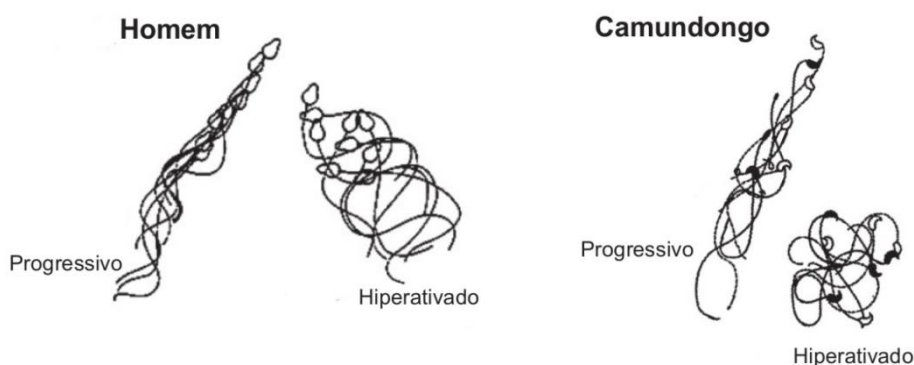


Figura 7. Padrões de motilidade identificados em espermatozoides humanos e murinos. Nos espermatozoides recém-ejaculados ou isolados da cauda do epidídimo é encontrada a motilidade progressiva, caracterizada por movimentos flagelares simétricos e vigorosos. A motilidade hiperativada é adquirida durante o processo de capacitação espermática e é caracterizada por batimentos flagelares assimétricos e de alta amplitude e trajetória circular ou irregular. Adaptado de Florman & Ducibella (2006).

Sabe-se que o $[Ca^{2+}]_i$ desempenha um papel importante na regulação da motilidade hiperativada (Suarez, 2008; Chang & Suarez, 2011). Estudos com espermatozoides de hamster demonstraram que as concentrações de $[Ca^{2+}]_i$ são maiores em espermatozoides hiperativados do que naqueles com motilidade progressiva (Suarez *et al.*, 1993). Estudos

demonstraram que aumento do $[Ca^{2+}]_i$ durante a hiperativação ocorre via entrada do Ca^{2+} extracelular pelo canal CatSper, sendo este o único canal de Ca^{2+} presente na membrana do espermatozoide essencial para este evento (Quill *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2007).

Além da hiperativação, outra maneira pela qual a capacitação prepara os espermatozoides para a fertilização, é tornando-os capazes de realizar a reação acrossômica (Balestrini *et al.*, 2020). Este evento ocorre no acrossoma, uma organela presente na cabeça dos espermatozoides composta por uma membrana acrossomal interna (MAI) que recobre a membrana nuclear; uma membrana acrossomal externa fusogênica (MAE) que está intimamente sobreposta à membrana plasmática sobre o acrossoma; e um segmento equatorial (SE), que forma a margem acrossomal posterior onde o MAI e a MAE se encontram (Eddy, 2006; Balestrini *et al.*, 2020). O acrossoma é proveniente do complexo de Golgi e apresenta as seguintes funções: i) servir como um local para o sequestro e liberação de proteínas necessárias para o reconhecimento, ligação e penetração da zona pelúcida; ii) permitir que o espermatozoide seja capaz de fundir-se com o oócito no momento da fertilização (Eddy, 2006). Diversas proteínas são encontradas na matriz acrossomal como, por exemplo, a acrosina (Takano *et al.*, 1993), SPESP1 (do inglês, *sperm equatorial protein 1*) (Wolkowicz *et al.*, 2003), TSSK6 (do inglês, *testis-specific serine/threonine-protein kinase 6*) (Sosnik *et al.*, 2009), calpains (Goll *et al.*, 2003), IZUMO 1 (Inoue *et al.*, 2005), dentre outras.

A reação acrossômica é estimulada tanto por proteínas da zona pelúcida do oócito quanto pela progesterona (secretada pelas células do cúmulus) (Buffone *et al.*, 2012). Além disso, esse evento pode ser estimulado por indutores exógenos, como o ionóforo de cálcio A23187 (Balestrini *et al.*, 2020). De maneira interessante, a reação acrossômica (também conhecida como exocitose acrossomal) não ocorre de maneira “tudo ou nada”, em que o acrossoma está “intacto” ou “reagido” (Kim & Gerton, 2003). Durante a capacitação, moléculas que compõem a matriz acrossomal sofrem diversas modificações estruturais e funcionais, incluindo: (i) mudanças no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina e serina/treonina de certas proteínas; (ii) mudanças na localização de proteínas entre os segmentos do acrossoma; e (iii) alterações no perfil de interações proteína-proteína de proteínas acrossomais (Belmonte *et al.*, 2016; Balestrini *et al.*, 2020). De fato, esse evento exocitótico promove alterações na topologia

e na composição da membrana celular espermática (Buffone *et al.*, 2008). Isso ocorre por meio de um processo, no qual vários poros de fusão se abrem conectando a membrana acrossomal externa à membrana plasmática. A junção desses poros promove a formação de vesículas híbridas compostas pela membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, que são eliminadas juntamente porções do citosol e do conteúdo acrossomal (Belmonte *et al.*, 2016). A reação acrossômica é iniciada no momento da capacitação e progride por vários estágios intermediários antes que a secreção do conteúdo acrossomal seja concluída (Kim & Gerton, 2003). Daremos enfoque a seguir nos mecanismos que ocorrem dentro de cada estágio desde um espermatozoide não estimulado até um espermatozoide estimulado com completa liberação do conteúdo acrossomal.

No espermatozoide em repouso, a membrana acrossomal externa é plana, estando disposta separadamente da membrana plasmática (Belmonte *et al.*, 2016) (Figura 8A). Essa disposição entre as membranas sugere que a maquinaria de fusão de membranas, constituída por proteínas SNAREs, está inativa (Jahn & Fasshauer, 2012; Rizo & Südhof, 2012). Outras proteínas importantes para o processo de exocitose, como os membros da família Rab (Rab3 e Rab27), a sinaptogamina e a ATPase NSF também estão em estado inativo, pelo menos em parte em decorrência de interações proteína-proteína que suprimem suas atividades (Belmonte *et al.*, 2016).

Nos estágios iniciais da reação acrossômica, o conteúdo acrossomal do espermatozoide estimulado incha, empurrando a membrana acrossomal externa em direção à membrana plasmática (Belmonte *et al.*, 2016) (Figura 8A). Esse inchaço é estimulado por indutores endógenos, como a progesterona (Lucchesi *et al.*, 2016; Sosa *et al.*, 2016), ou exógenos, como ionóforo de cálcio A23187 (Zanetti & Mayorga, 2009). Em seguida, ocorrem deformações na membrana acrossomal externa, limitando seus contatos com a membrana plasmática às bordas das invaginações, e dessa forma ocorre o aparecimento de vesículas intra-acrossomais (Figura 8A). No espermatozoide estimulado em estágio de preparação para a fusão, observa-se a ativação das proteínas Rab27 e Rab3, concomitantemente ao inchaço no acrossoma (Branham *et al.*, 2009). Além disso, as proteínas SNAREs, sinaptotagmina e NSF também se tornam ativas. No momento de fusão de um espermatozoide estimulado, que ocorre ~13 min

após o início da reação acrossômica (Sosa *et al.*, 2015), nota-se que 50% dos espermatozoides apresentam acrossomas inchados com numerosas regiões estreitas entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática da célula (Zanetti & Mayorga, 2009), sendo estas a marca registrada de acrossomas que se fundiram (Figura 8A).

Após a fusão da membrana acrossomal externa e membrana plasmática, as etapas exocitóticas restantes até que o conteúdo acrossomal seja definitivamente liberado ocorrem de maneira muito rápida (na ordem de segundos) (Sosa *et al.*, 2015) (Figura 8A). Um dos primeiros eventos moleculares que ocorrem após a fusão é o efluxo de cálcio do reservatório acrossomal através de canais sensíveis ao inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3), visto que o acrossoma se comporta como um estoque interno de cálcio (Belmonte *et al.*, 2016). Na maioria das células, os poros de fusão formados pelo contato entre membrana acrossomal externa e membrana plasmática alargam-se, o que resulta na formação de vesículas híbridas contendo conteúdo acrossomal e citosol, que são liberadas da cabeça do espermatozoide (Figura 8A). Após a liberação das vesículas híbridas no acrossoma reagido, a membrana acrossomal interna comporta-se como membrana principal na superfície da cabeça do espermatozoide (Figura 8A) (Belmonte *et al.*, 2016). Durante a reação acrossômica, proteínas presentes na membrana acrossomal interna, como a IZUMO1 (Inoue *et al.*, 2005), são expostas na superfície da cabeça ou migram para o segmento equatorial, ativando outras proteínas presentes nessa região (Figura 8B). Dessa forma, essas proteínas participam da aquisição da fusogenicidade do espermatozoide ao oócito (Figura 8B) (Belmonte *et al.*, 2016).

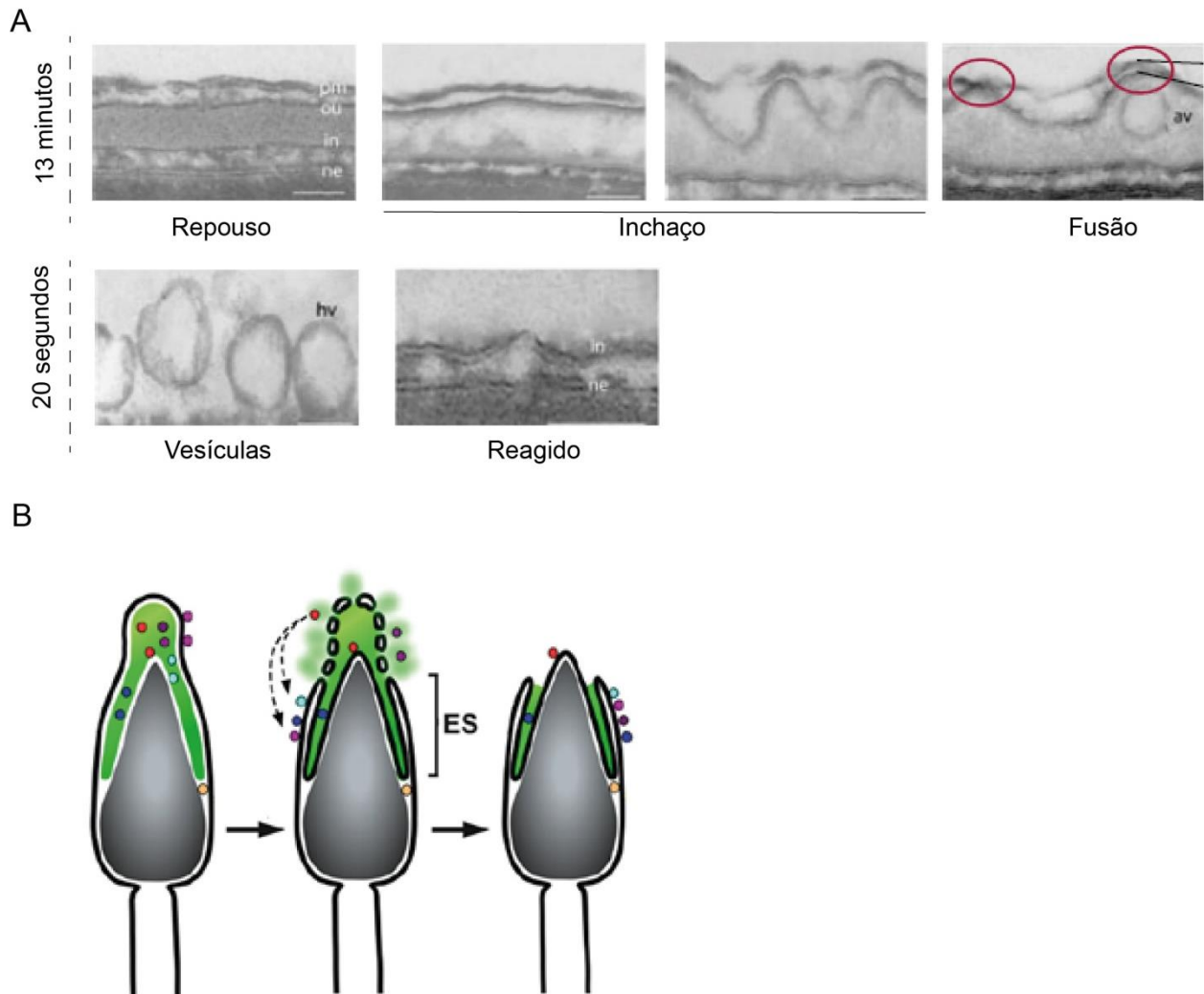


Figura 8. (A) Estágios morfológicos do acrossoma durante a reação acrossômica. No estágio de REPOUSO, o acrossoma é plano, com evidente separação entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática. Após a exposição a indutores endógenos ou exógenos o acrossoma sofre um INCHAÇO. Após o inchaço a membrana acrossomal externa e a membrana acrossomal interna se fundem no estágio de FUSÃO. Em seguida, ocorre a liberação do cálcio dos estoques de cálcio intracelulares e uma cascata de reações ocorre até a abertura dos poros de fusão, ainda não capturados em microscopia. Posteriormente, VESÍCULAS híbridas são formadas com porções da membrana acrossomal externa e membrana plasmática que são liberadas da cabeça do espermatozoide contendo conteúdo acrossomal e citosol. Aproximadamente 50% dos acrossomas fundidos tornam-se vesiculados em apenas 20 segundos. Nos espermatozoides REAGIDOS, a membrana plasmática interna torna-se a membrana principal. **(B)** Rearranjo das proteínas durante a reação acrossômica e a aquisição da fusogenicidade do segmento equatorial do espermatozoide. Ilustração demonstrando inúmeras proteínas espermáticas que supostamente estão envolvidas na aquisição da fusogenicidade do segmento equatorial. Essas modificações ocorrem por meio da alteração de proteínas do citoesqueleto (círculo laranja TSSK6) e/ou proteínas de membrana presentes no segmento equatorial (círculo vermelho representa a acrosina, círculo azul escuro é a proteína SPESP1) ou realocando para o segmento equatorial para participar da fusão de gametas (círculo azul claro IZUMO1, círculo rosa representa CRISP1 e também a CRISP2, representada pelo círculo magenta). Adaptado de Buffone (2016).

3. Controle da motilidade espermática e dos eventos associados à capacitação

Proteínas do plasma seminal têm a capacidade de se ligar aos espermatozoides ejaculados e controlar sua função (Yoshida *et al.*, 2008). Dentre as proteínas identificadas no

plasma seminal de mamíferos, os membros da família REST (do inglês, *Rapidly-envolving seminal vesicle-transcribed*), provenientes do fluído da glândula seminal, são os principais integrantes do plasma seminal, sendo componentes estruturais do coágulo de sêmen, estrutura de alta viscosidade formada logo após a ejaculação e que prende os espermatozoides no seu interior, inibindo sua motilidade progressiva e eventos associados à capacitação (Robert & Gagnon, 1999; Yoshida *et al.*, 2008).

Em humanos, a SEMG1 e SEMG2 são as principais proteínas REST's identificadas no sêmen, representando de 20 a 40% das proteínas do plasma seminal (Robert & Gagnon, 1999). Os genes *SEMG1* e *SEMG2* são parálogos, apresentam 3 éxons e 2 íntrons e estão localizados em um cluster gênico no cromossomo 20, o qual contém diferentes genes da família WFDC (do inglês, *whey acidic protein four-disulfide-core* (CLAUSS; LILJA; LUNDWALL, 2005). A SEMG1 e SEMG2 são ricos em glutamina, serina, glicina e lisina e contêm de um a dois resíduos de cisteína em sua estrutura primária (SEMG1: C239; SEMG2: C159 e C360).

A semenogelina-1 (SEMG1) é o principal componente do coágulo de sêmen humano, sendo encontrada em concentrações que variam de 10 a 20 mg/ml (200 a 400 µM) (Robert & Gagnon, 1999). Estudos mostram que a associação da SEMG1 com a superfície dos espermatozoides ejaculados promove efeito modulatório sobre suas funções ao inibir a motilidade progressiva e eventos associados à capacitação (de Lamirande *et al.*, 2001; de Lamirande & Lamothe, 2010; Mitra *et al.*, 2010; O'Rand & Widgren, 2012). Do ponto de vista fisiológico, a degradação da SEMG1 pela serino-protease prostática (PSA) induz a liquefação do coágulo de sêmen, permitindo a aquisição de motilidade progressiva pelos espermatozoides (Robert & Gagnon, 1999; Anamthathmakula & Winuthayanon, 2020). A relevância desse evento para a fertilidade pode ser demonstrada pelo fato de que homens com alterações no tempo de liquefação do coágulo de sêmen são inférteis ou subférteis (Robert & Gagnon, 1995).

Estudos de função, nos quais diversos fragmentos da SEMG1 foram testados a fim de identificar o domínio da SEMG1 responsável pela inibição da motilidade espermática, demonstraram que a sequência de aminoácidos na posição 24-283 da SEMG1, contendo seu único resíduo de cisteína (posição 239), possui o domínio responsável pela modulação da motilidade do espermatozoide humano (Wang *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2013). De fato,

mutações nesse resíduo por aminoácidos como glicina, arginina e histidina reduziram a capacidade da SEMG1 de inibir a motilidade espermática, confirmando o papel crucial da cisteína 239 para essa função (Silva *et al.*, 2013). Os efeitos inibitórios da SEMG1 sobre a função espermática parecem ser mediados por diferentes mecanismos que promovem redução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bloqueio da alcalinização do $[pH]_i$ e do aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (O'Rand & Widgren, 2012). Apesar desses avanços, os mecanismos moleculares pelos quais a SEMG1 modula a função do espermatozoide ejaculado e, consequentemente, a fertilidade masculina ainda são pouco conhecidos.

Em camundongos, as proteínas membros da família REST são as proteínas SVS's (do inglês, *seminal vesicle-secretory proteins*). Oito SVS's (SVS1, SVS2, SVS3A, SVS3B, SVS4, SVS5, SVS6 e SVS7) foram descritas no plasma seminal murino, sendo codificadas por genes diferentes que evoluíram rapidamente por processos de duplicação (Clauss *et al.*, 2005). Dentre estes, os genes *Svs2*, *Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5* e *Svs6* estão localizados em um cluster gênico *WFDC* no cromossomo 2 murino, ortólogo aquele presente no cromossomo 20 humano. Dentre as funções conhecidas das proteínas SVS's, podemos citar: i) formação do plugue copulatório (Kawano *et al.*, 2014; Mangels *et al.*, 2015); ii) atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (Galdiero *et al.*, 1989; Metafora *et al.*, 1989a; Metafora *et al.*, 1989b); iii) atividade inibitória de serino-proteases (Porta *et al.*, 1993); iv) papéis no controle motilidade e capacitação espermática (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2008; Araki *et al.*, 2015; Araki *et al.*, 2016); v) promoção da viabilidade espermática no ambiente uterino (Kawano *et al.*, 2014; Sakaguchi *et al.*, 2020).

Apesar do baixo grau de conservação da sequência primária a SVS2 murina é considerada ortóloga à SEMG1 humana. De forma semelhante à SEMG1, a SVS2 é o componente mais abundante do plasma seminal murino, com concentração na faixa de 25 μM , e é um componente integral do coágulo de sêmen e do plugue copulatório (Kawano & Yoshida, 2007; Mangels *et al.*, 2015). Vale ainda destacar que estruturalmente, a SVS2 também é rica em resíduos de glutamina, serina, glicina e lisina, organizados em repetições imperfeitas *in tandem* e contêm apenas um resíduo de cisteína em sua sequência primária.

Além das semelhanças estruturais, a SVS2 desempenha papéis equivalentes aos da

SEMG1 no controle da função espermática. Por exemplo, a SVS2 inibe a motilidade hiperativada, atuando como um fator decapacitante (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2008). Estudos demonstram que a exposição de espermatozoides murinos à SVS2 nativa ou recombinante também inibiu a fosforilação das proteínas induzida pela capacitação, a reação acrossômica espontânea e induzida por progesterona e ionóforo A23187 e a taxa de fertilização in vitro (Kawano & Yoshida, 2007; Araki *et al.*, 2015; Araki *et al.*, 2016). Além disso, camundongos nocautes para o gene *Svs2* são subférteis devido à falta do plugue copulatório e às altas taxas de morte dos espermatozoides no útero (Kawano *et al.*, 2014). Na ausência da SVS2, observou-se morte prematura dos espermatozoides, devido à ruptura da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides durante o trânsito pelo útero (Kawano *et al.*, 2014).

Conforme demonstrado acima, a interação das proteínas REST's com o espermatozoide é um processo essencial para a reprodução. Nesse contexto, a proteína espermática EPPIN (do inglês, *Epididymal protease inhibitor protein*) assume um papel fundamental por atuar como sítio de ancoragem da SEMG1 e SVS2 no espermatozoide humano (Wang *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012a; Silva *et al.*, 2013) e murino (Mariani *et al.*, 2020), respectivamente. Descobertas nos últimos 20 anos revelaram que a interação entre a EPPIN e a SEMG1 é um evento passível de intervenção farmacológica, o que alçou a EPPIN ao topo da lista de alvos espermáticos para contracepção masculina não hormonal, conforme abordaremos a seguir.

3.1. A EPPIN como alvo farmacológico para contracepção masculina não hormonal

A EPPIN é uma proteína rica em resíduos de cisteína, exibindo um peptídeo sinal típico de proteínas secretadas, e dois domínios inibidores de proteases: do tipo WFDC, na região N-terminal, e do tipo Kunitz, na região C-terminal (Figura 10). Em humanos e camundongos a EPPIN possui 133 e 134 resíduos de aminoácidos, respectivamente, apresentando alto grau de conservação em sua sequência primária. Em humanos, o gene *EPPIN* está localizado no cromossomo 20q12-q13, em um cluster gênico contendo outros genes que codificam proteínas do tipo WFDC (Whey acidic protein-type four disulfide core gene family) e/ou Kunitz (Richardson *et al.*, 2001). Loci ortólogos conservados desse cluster gênico estão presentes no cromossomo 2 de camundongos (Clauss *et al.*, 2005).

EPPIN

Humano	mgssgllslvlvflvllanvqgPGLTDWLFPRRCPKIREEECFQERDVCTKDRQCQDNKKCCVFS CGKKCLDLKQ	74
camundongo	mklsgfvsilvlfglarvqgPSLADLLFPRRCPRFREECHEQERDLCTDRDCPKKEKCCVFN CGKKCLNPQQ	74
Humano	DVCEMPKETGECIAYFLWWYDKKDNTCSMFVYGGCGGNNNNFOSKANCINTCKNKRFP-	133
Camundongo	DICSLPKDSGYCMAYFRWWENKENSTCOVFTYGGCGGNNNNFOSOSICONACEKKSSLT	134

Figura 10: Alinhamento das sequências primárias da EPPIN humana (NP_065131) e murina (NP_083601). O peptídeo sinal está apresentado em letras minúsculas. Os domínios WFDC e Kunitz estão sublinhados com linhas contínuas e pontilhados, respectivamente. Os resíduos idênticos e conservados entre a EPPIN humana e murina estão destacados em amarelo e cinza, respectivamente.

Os perfis de expressão da EPPIN humana e murina são semelhantes, sendo abundantemente expressa nos testículos e no epidídimo como um produto das células de Sertoli e células espermato gênicas, e de células epiteliais epididimárias, respectivamente (Richardson *et al.*, 2001; Sivashanmugam *et al.*, 2003; Mariani *et al.*, 2020). A EPPIN também é encontrada na superfície de espermatozoides testiculares, epididimários e ejaculados (Richardson *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2012b; Mariani *et al.*, 2020). Dados do nosso grupo demonstraram aumento da expressão da EPPIN em espermatozoides maduros em comparação com os imaturos, isolados das regiões distal e proximal do epidídimo, respectivamente, o que indica um papel dessa proteína em eventos de maturação espermática pós-testicular (Silva *et al.*, 2012b; Mariani *et al.*, 2020).

É sabido que a EPPIN apresenta ao menos três funções fisiológicas: (I) atividade bactericida, sendo considerada um elemento do sistema imunológico inato associado ao espermatozoide (Yenugu *et al.*, 2004; McCrudden *et al.*, 2008); (II) atividade moduladora da enzima prostática PSA, o que auxilia no controle da liquefação do coágulo de sêmen (Wang *et al.*, 2007); e (III) atuação como sítio de interação da SEMG1 na superfície do espermatozoide, evento que culmina na modulação da função espermática (Wang *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012a; Silva *et al.*, 2013). Dessa forma, a EPPIN atua como uma proteína envolvida em eventos cruciais para a viabilidade do espermatozoide durante sua jornada pelo sistema genital feminino até o local de fertilização do oócito. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que polimorfismos de nucleotídeo único no gene *EPPIN* foram associados ao risco aumentado ou diminuído infertilidade idiopática por alterações em parâmetros espermáticos (Ding *et al.*,

2010).

Tendo em vista que a interação EPPIN/SEMG1 afeta eventos cruciais para a função espermática, a EPPIN vem sendo explorada como alvo espermático para estratégias farmacológicas visando o desenvolvimento de contraceptivos masculinos (O'Rand *et al.*, 2016). Em estudo seminal de prova de princípio, O'Rand *et al.* (2004) demonstraram que anticorpos anti-EPPIN produzidos a partir da imunização de macacos com a EPPIN recombinante humana induziram infertilidade reversível em decorrência de oligospermia e alterações na liquefação do sêmen, confirmando que ligantes da EPPIN podem inibir a função espermática *in vivo*. Estudos posteriores confirmaram a capacidade dos anticorpos anti-EPPIN isolados dos macacos imunizados de inibirem a motilidade do espermatozoide humano, de forma semelhante ao observado com a SEMG1 (O'Rand *et al.*, 2009). De forma consistente, o anticorpo anti-EPPIN S21C, que reconhece epítopo que engloba a sequência Y¹⁰⁷-F¹¹⁷ (Figura 10), promoveu a inibição da motilidade do espermatozoide humano (O'Rand *et al.*, 2011; O'Rand & Widgren, 2012). De maneira interessante, a incubação de espermatozoides humanos a anticorpos anti-EPPIN que reconhecem epítopos nos seus domínios WFDC e Kunitz resultou em inibição da reação acrossômica induzida pelo ionóforo de cálcio A23187, sugerindo o envolvimento da EPPIN em outros eventos pós-testiculares além do controle da motilidade (Zhang *et al.*, 2010).

Esse conhecimento foi aplicado ao desenho racional de ligantes experimentais da EPPIN que mimetizam os efeitos inibitórios da interação SEMG1/EPPIN sobre a motilidade espermática (O'Rand *et al.*, 2011; O'Rand *et al.*, 2016; O'Rand *et al.*, 2018). Um desses compostos, conhecido como EP055, que interage com a EPPIN em região semelhante à SEMG1 e ao anticorpo anti-EPPIN S21C e inibe a motilidade do espermatozoide humano *in vitro* (IC₅₀ $\cong$ 200 μ M), induziu inibição reversível da motilidade espermática após administração endovenosa em dose única em macacos *rhesus* (O'Rand *et al.*, 2018).

Vale salientar que as funções da EPPIN estão intimamente relacionadas aos seus domínios WFDC e Kunitz. Por exemplo, a atividade bactericida da EPPIN contra cepas de *E. coli* é mediada por ambos os domínios WFDC e Kunitz, enquanto sua atividade inibitória de proteases, como a elastase, é mediada principalmente pelo domínio Kunitz (McCrudden *et al.*, 2008). O domínio Kunitz da EPPIN também possui o domínio de interação com a SEMG1,

estando associado ao controle da função espermática (Wang *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012a). De fato, a sequência flanqueada pelos aminoácidos Tyr¹⁰⁷ e Phe¹¹⁷ no domínio Kunitz da EPPIN (Y¹⁰⁷GGCQGNNNF¹¹⁷) forma o bolsão de interação com a SEMG1 (Figura 10) (Silva *et al.*, 2012a). Mutações nos resíduos Tyr¹⁰⁷→Ala e Phe¹¹⁷→Ala reduziram a capacidade da EPPIN de interagir com a SEMG1 em aproximadamente 70% em comparação com a proteína selvagem (Silva *et al.*, 2012a). De maneira interessante, estudos de modelagem por homologia e ancoragem molecular revelaram que resíduos no domínio WFDC da EPPIN, como Arg32 e Arg33, também podem formar ligações com resíduos da SEMG1, além de atuar na estabilização da estrutura secundária da sequência Tyr¹⁰⁷-Phe¹¹⁷ no domínio Kunitz (Shan *et al.*, 2019). Nesse contexto, esclarecer as contribuições dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN no controle da função espermática fomentará o melhor entendimento dos papéis da EPPIN na reprodução, bem como o desenvolvimento de novos ligantes com maior seletividade e atividade espermotática.

Visando contribuir para avanços nesse sentido, nosso grupo vem se dedicando ao estudo das funções e mecanismos de ação da EPPIN sobre eventos de maturação espermática pós-testicular utilizando o camundongo como sistema modelo. Utilizando estratégias experimentais de proteômica, bioinformática e de interação proteína-proteína, demonstramos que a EPPIN presente no espermatozoide maduro de camundongos também atua como sítio de ancoragem da SVS2, indicando a existência de um sistema equivalente para o controle da função espermática pelo plasma seminal entre humanos e camundongos (Mariani *et al.*, 2020). Em suporte adicional a esta hipótese, demonstramos mais recentemente que anticorpos que reconhecem epítopos nos domínios WFDC e Kunitz inibiram de forma diferencial a motilidade progressiva e hiperativada do espermatozoide murino (Silva *et al.*, dados não publicados).

Em conjunto, esses resultados indicam o envolvimento dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN em eventos espermáticos além da motilidade, incluindo aqueles associados à capacitação, como reação acrossômica e fertilização. Desvendar esses papéis fisiológicos de EPPIN abrirá novas possibilidades de sua exploração como alvo para contracepção masculina. Neste estudo, testamos a hipótese de que ligantes endógenos (SVS2) e exógenos (anticorpos anti-EPPIN) modulam eventos associados à capacitação espermática, incluindo perfil de

fosforilação de proteínas, reação acrossômica e fertilização. Para tal, investigamos se a SVS2 murina recombinante (SVS2r) e anticorpos anti-EPPIN que interagem com epítomos específicos nos domínios WFDC (anticorpos Q20E e F15C, contra os resíduos Q²⁰-E³⁹ e F²⁹-C⁴³ da EPPIN murina, respectivamente) e Kunitz (anticorpo S21C, contra os resíduos S¹⁰³-C¹²³ da EPPIN humana) alteram os seguintes parâmetros espermáticos associados à capacitação: (i) perfil de fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina e serina/treonina; (ii) a atividade da PKA; (iii) taxa de reação acrossômica espontânea e induzida com ionóforo de cálcio (A23187); e (iv) taxas de fertilização in vitro. Além disso, avaliamos se a EPPIN humana e murina são alvos de fosforilação por proteínas quinases.

Capítulo 2

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Estudar os efeitos de ligantes endógenos (SVS2) e exógenos da EPPIN (anticorpos anti-EPPIN) sobre parâmetros associados à capacitação e função de espermatozoides de camundongos, para avançar no entendimento dos papéis fisiológicos da EPPIN sobre a fertilidade e sua exploração como alvo para contracepção masculina.

2. Objetivos específicos

- Avaliar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C, Q20E e F15C, e SVS2r afeta a fosforilação em resíduos de tirosina e de serina/treonina de proteínas espermáticas.
- Avaliar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C, Q20E e F15C afeta a fosforilação de substratos da PKA.
- Investigar se a incubação de espermatozoides murinos incubados com anticorpos anti-EPPIN S21C, Q20E e F15C afeta a taxa de reação acrossômica espontânea e induzida.
- Avaliar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C, Q20E e F15C afeta as taxas de fertilização in vitro.
- Identificar os potenciais sítios de fosforilação da EPPIN humana e murina.

Capítulo 3

Artigo apresentado segundo as regras do periódico **Biology of Reproduction**
Fator de impacto (2020): 4,285

Instruções aos autores: https://academic.oup.com/biolreprod/pages/Author_Guidelines

Differential effects of EPPIN ligands on capacitation-associated events in mouse spermatozoa

Tamiris R. Fanti Raimundo¹, Noemia Aparecida P. Mariani¹, Alan Andrew S. Silva¹, Alexandre D. Andrade¹, Mariano G. Buffone², Fabíola F. P. Lopes³, Hélio Kushima¹, Marcelo T. Moura³, Erick J. R. Silva^{1*}.

¹*Department of Biophysics and Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu-São Paulo, Brazil.*

²*Section of Biología Celular y Molecular de la Reproducción, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina*

³*Section of Cellular and Developmental Biology, Department of Biological Sciences, Universidade Federal de São Paulo–Campus Diadema, Diadema, Brazil*

**Correspondence: Erick J.R. Silva, ejr.silva@unesp.br*

ABSTRACT

EPPIN is a cysteine-rich protein containing both WFDC-type and Kunitz-type protease inhibitor domains. EPPIN coats the surface of spermatozoa as part of a protein complex with the seminal plasma protein SEMG1, leading to transient inhibition of sperm motility upon ejaculation. Anti-EPPIN antibodies mimicking SEMG1 displayed spermostatic activity, rendering EPPIN a promising drug target for male contraception. We previously showed that SVS2 (a SEMG1 homolog) is an EPPIN-binding partner in mouse spermatozoa, indicating that EPPIN roles in sperm function are evolutionarily conserved in humans and mice. Although both SEMG1 and SVS2 inhibit sperm capacitation, little is known on the involvement of EPPIN in these events. We investigated whether antibodies recognizing epitopes in EPPIN WFDC (Q20E and F15C antibodies) and Kunitz (S21C antibody) domains modulate capacitation-induced protein phosphorylation, acrosome reaction (AR), and in vitro fertilization rates in mouse spermatozoa. We observed that incubation of mouse spermatozoa with recombinant mouse SVS2 (rSVS2; 1-25 μ M) during capacitation inhibited tyrosine and serine/threonine phosphorylation, an effect not reproduced by the Q20E, F15C, and S21C antibodies (10-300 μ g/ml). Conversely, the S21C antibody increased sperm phospho-PKA substrate levels and inhibited sperm fertilization rates, indicating that this antibody affected their fertilizing potential. We observed no effects of anti-EPPIN antibodies on spontaneous and A23187-induced AR, except by a slight increase in induced by the F15C antibody. We conclude that targeting EPPIN affects sperm function by disrupting capacitation-associated events. Hence, our findings open avenues for novel strategies for EPPIN-based male contraceptive drug development targeting post-testicular maturation events.

INTRODUCTION

The mammalian spermatozoon is the only cell type produced in males that achieves its function in the female reproductive tract [1]. Spermatozoa are the end product of spermatogenesis, a cell division and differentiation process occurring in the seminiferous tubules [2]. After leaving the testis, spermatozoa undergo a maturation process during their

journey through the epididymis, acquiring forward motility and fertilizing capacity [3]. This process, known as epididymal maturation, includes modifications in the structure and fluidity of the sperm membrane and chemical interactions between components of the flagellum, such as increases in protein-protein disulfide linkages, promoting the stability of the outer dense fibers, mitochondria, and fibrous sheath. Moreover, metabolic enzymes have their activity altered during epididymal maturation, contributing to changes in the composition of membrane phospholipids [4]. The events during epididymal maturation are mediated by interactions between factors secreted from the epididymal epithelium cells and those present in spermatozoa [3]. Mature spermatozoa are stored in a quiescent state in cauda epididymidis until ejaculation.

Immediately after ejaculation, spermatozoa are embedded and arrested in the semen coagulum, which blocks their forward motility [5]. In the female reproductive tract, the liquefaction of the semen coagulum, induced by the proteolytic enzyme PSA, is essential for spermatozoa to acquire forward motility and successfully move to the site of fertilization [6]. Before fertilizing the oocyte, spermatozoa must undergo a second post-testicular maturation event composed of a series of biochemical, molecular, and functional changes, collectively known as sperm capacitation [3,7]. Capacitation is associated with increased production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP; via activation of soluble adenylyl cyclase – ADCY10), alkalinization of intracellular pH, raises intracellular Ca^{2+} levels, and the activity of several kinases that promote tyrosine and serine/threonine phosphorylation [8,9].

Seminal plasma proteins can bind spermatozoa, thus controlling capacitation-related processes. Indeed, semenogelin-1 (SEMG1), the major component of the human seminal plasma, binds spermatozoa in the semen coagulum blocking their ability to move progressively [10,11]. Further studies demonstrated SEMG1 blocks sperm capacitation-associated events, such as acrosome reaction and hyperactivated motility, at least partially via inhibition of intracellular pH alkalinization, intracellular Ca^{2+} level increases, tyrosine phosphorylation, and production of reactive oxygen species [10,12,13]. These modulatory effects of SEMG1 in spermatozoa are mediated by its interaction with the sperm-binding protein EPPIN (Epididymal protease inhibitor protein) [10,14].

EPPIN is a cysteine-rich secretory protein, displaying two protease inhibitor domains: a WFDC-type domain in the N-terminal region and Kunitz-type domain in the C-terminal region. It has been recognized that EPPIN/SEMG1 interaction is a major event regulating sperm function in the semen coagulum [10]. Consistently, anti-EPPIN antibodies that mimic SEMG1 binding to EPPIN have been shown to inhibit sperm forward motility and acrosomal exocytosis in human spermatozoa [16,20,21]. In this scenario, EPPIN has emerged as a sperm-surface drug target for male contraception [16,17]. Small organic EPPIN ligands, such as the compounds B4 and EP055 mimic the effects of SEMG1 and anti-EPPIN antibodies, rendering spermatozoa immotile [18]. The molecular mechanisms underlying these events, however, are yet to be elucidated. Thus, further understanding of EPPIN physiological roles on sperm motility and capacitation has the potential to facilitate its development as a contraceptive drug target [5,16,19].

We have recently demonstrated that seminal vesicle secretory protein 2 (SVS2) is an EPPIN binding partner in mouse spermatozoa [26]. SVS2 is the most abundant component of mouse seminal plasma and ortholog to human SEMG1 [27–29]. SVS2 plays key roles in forming the copulatory plug and regulating capacitation in mouse spermatozoa [27,28,30]. Consistently, studies have shown that SVS2 decreases the phosphorylation of mouse sperm proteins, acrosome reaction rates, and the rate of in vitro fertilization, acting as a decapacitating factor [22]. Moreover, *Svs2* knock-out mice are subfertile due to the lack of copulatory plug and high rates of sperm death in the uterus [27]. We have demonstrated that EPPIN and SVS2 co-localize in mouse sperm head and flagellum [26]. We provided further evidence of EPPIN/SVS2 interaction via (i) co-immunoprecipitation of SVS2 in murine spermatozoa pre-incubated with seminal gland fluid with anti-EPPIN antibody; (ii) interaction of recombinant EPPIN and SVS2 by far Western blot; (iii) co-localization of EPPIN with native and recombinant SVS2 in mature spermatozoa. These observations indicated that the effects of SVS2 in the modulation of sperm function are mediated by EPPIN binding, supporting the hypothesis that EPPIN roles on male fertility are conserved between humans and mice. Thus, the mouse is an attractive model to study further the roles of EPPIN on male fertility and the contributions of its WFDC and Kunitz domains for sperm function [26].

To provide new insights into the roles of EPPIN in sperm capacitation-associated events, we investigated whether recombinant SVS2 (rSVS2) and anti-EPPIN antibodies mapping epitopes in EPPIN WFDC (Q20E and F15C antibodies, raised against residues Q²⁰-E³⁹ and F²⁹-C⁴³ of mouse EPPIN, respectively) and Kunitz (S21C antibody, raised against residues S¹⁰³-C¹²³ human EPPIN) domains changes capacitation-associated events, including phosphoprotein profile, acrosome reaction rates and fertilizing ability in mouse spermatozoa. We further investigated whether human and mouse EPPIN are targets of phosphorylation by protein kinases. Our findings showed that rSVS2, but not anti-EPPIN antibodies, inhibited both tyrosine and serine/threonine phosphorylation in mouse spermatozoa. Conversely, incubation of spermatozoa with S21C antibody during capacitation increased phospho-PKA substrate levels and decreased *in vitro* fertilization (IVF) rates. We identified that residues S¹¹⁹ and T¹²⁶ in human EPPIN, and S¹¹⁹, S¹²¹, and S¹³² in mouse EPPIN are putative targets of protein kinases, suggesting that they could undergo protein phosphorylation during sperm capacitation. Altogether, our findings open new avenues to understand the roles of EPPIN on post-testicular sperm maturation events and in the fertilizing potential of spermatozoa, fostering advances in the development of novel strategies for nonhormonal male contraception.

MATERIAL AND METHODS

Animals

We used C57BL/6 male mice (12-16 weeks old), purchased from Anilab Laboratory (Brazil). For IVF assays, we used male Swiss mice (12-16 weeks old) of proven fertility and female hybrid F1 breed from male Balb/C and female C57BL/6 mice (CB6F1, 8-12 weeks old). We housed the animals under controlled conditions (12 h light/dark cycle, 21–24°C), with food and water *ad libitum*. We performed all animal experiments in compliance with the Animal research: Reporting of *in vivo* experiments (ARRIVE) guidelines, the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, USA), and the National Council of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil) guidelines for animal care and use of laboratory animal. Animal procedures were approved by the Research Committee in the Use of Animals (CEUA)

from IBB/UNESP (processes #1183 and #1138) and UNIFESP-Diadema (process #2521131119).

Anti-EPPIN antibodies and recombinant SVS2

We used affinity-purified rabbit polyclonal anti-EPPIN antibodies mapping N-terminal and C-terminal sequences of EPPIN described in Table 1 and Supplementary Figure 1. Anti-EPPIN S21C antibody to the C-terminal of human EPPIN was kindly provided by Dr. Michael G. O'Rand, the University of North Carolina at Chapel Hill (UNC), USA. Anti-EPPIN Q20E and F15C polyclonal antibodies to the N-terminal of murine EPPIN were produced by GenScript Inc. (China).

Table 1. Information about antibodies used in the experiments.

Anti-EPPIN antibody	Epitope sequence	Region/domain	NCBI accession number
S21C	¹⁰³ SMFVYGGCQGNNNNFQSKANC ¹²³	C-terminal/Kunitz	NP_065131
Q20E	²⁰ QGPSLADLLFPRRCPRFREE ³⁹	N-terminal/WFDC	NP_083601
F15C	²⁹ FPRRCPRFREECEHC ⁴³	N-terminal/WFDC	NP_083601

See Supplementary Figure S1 for epitopes and EPPIN primary sequence alignment.

Purified recombinant N-terminal 6xHis-tag mouse SVS2 (rSVS2, Q32-G375) produced in *E. coli* was purchased from GenScript Inc. After purification, rSVS2 was submitted to an endotoxin removal protocol (2.2 endotoxin units/mg of recombinant protein), refolded, and stored in PBS buffer containing 10% glycerol and 0.5 M arginine, pH 7.4 until use.

Mouse spermatozoa preparation and capacitation

Male mice were euthanized by cervical dislocation, and their cauda epididymidis were dissected and placed in 1 ml pre-warmed TYH medium (100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 0.8 mM pyruvic acid, 1.7 mM CaCl₂ and 20 mM

HEPES, pH 7.2-7.4). Several cuts were carefully made in the cauda epididymidis using an ophthalmic pair of scissors, allowing sperm release into the medium. After 10 min at 37°C (5% CO₂/95% air), tissue debris was removed, and sperm count was performed using a Neubauer haemocytometer.

For western blot assays, aliquots of sperm suspension (5×10^6 cells/ml) were diluted in 200 µl of capacitating TYH medium (supplemented with 15 mM NaHCO₃ and 0.75% BSA w/v) [25] in the presence of normal rabbit IgG (300 µg/ml) or normal rabbit IgG Fab fragments [IgG(Fab), 300 µg/ml] as control. The aliquots of sperm suspension were also incubated in the presence of anti-EPPIN Q20E, F15C, and S21C antibodies (10, 100 and 300µg/ml) or Q20E and S21C antibodies Fab fragments [S21C(Fab); Q20E(Fab), 300 µg/ml] for 120 min at 37°C (5%/ 95% CO₂/air). Sperm samples were also incubated under capacitating conditions in the presence of rSVS2 (1, 10, and 25 µM) or absence (control). For acrosomal exocytosis assays, aliquots of sperm suspension (1.2×10^6 cells/ml) were diluted in 100 µl of capacitating TYH medium in the presence of normal rabbit IgG (control, 300 µg/ml) or anti-EPPIN Q20E, F15C and S21C antibodies (10 and 300µg/ml) for 60 min at 37°C (5%/ 95% CO₂/air). Normal rabbit IgG, anti-EPPIN antibodies and rSVS2 were dialyzed against TYH medium before incubation of spermatozoa. Sperm samples that were either immediately processed after isolation from the cauda epididymidis or incubated in capacitating conditions for 120 min in TYH medium only used as non-capacitating (NC) and capacitating (CAP) controls.

For IVF, the cauda epididymidis of Swiss adult male mice were dissected and incubated in 1mL drop of capacitating TYH medium covered with pre-warmed mineral oil. We collected the coat of spermatozoa from cauda epididymidis, incubated the plate for 10 minutes into incubator with 5% CO₂, saturated humidity at 37 °C). Next, we incubated spermatozoa with absence or presence of anti-EPPIN antibodies on sperm capacitation.

SDS Page and Western blotting

Western blot was performed according to the protocol described by Alvau et al. (2016) [25]. Briefly, sperm samples were washed with 1ml of phosphate-buffered saline (PBS, Na₂HPO₄ anhydrous 10mM, NaH₂PO₄H₂O 1,4Mm, NaCl 150mM, pH 7.4), centrifuged (800 x g, 24°C,

10min), resuspended in Novex™ Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X) (Thermo Fisher Scientific, #LC2676) and boiled at 85 °C for 5 min. Then, samples were centrifuged (12000 x g, 24°C, 5min), and the supernatant was collected. The reducing agents Dithiothreitol DTT (1X) (Thermo Fisher Scientific, #B0009) and Tris (2-carboxyethyl) phosphine TCEP (1X) (Sigma Aldrich, #646547) were added to the supernatant, and samples were boiled again under the same conditions. Total proteins were size-separated on Novex gel 10% SDS-PAGE (m/v) (Thermo Fisher Scientific, #XP00100BOX) for ~20 min at 225 V, followed by transfer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Thermo Fisher Scientific, #88520) using Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) for 60min at 20V. The transfer was verified by amido black staining.

Membranes were then incubated to anti-pY (mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody, clone 4G10, MerckMillipore, #05-321, 1 µg/ml), diluted in blocking solution containing 3% fat-free milk (m/v) in TBS-T buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20, v/v), anti-pThr (rabbit polyclonal anti-phosphothreonine antibody, MerckMillipore, #1607, 1 µg/ml) diluted in blocking solution containing 3% Bovine Serum Albumin (BSA, m/v) in TBS-T buffer, anti-pSer (rabbit polyclonal anti-phosphoserine antibody, MerckMillipore, #1603, 12 ng/ml) diluted in blocking solution containing 1% BSA (m/v) in TBS-T, pPKAs (Rabbit polyclonal anti-phosphoPKA substrate antibody, CellSignaling Technology, #9624, 1:300) diluted in blocking solution containing 5% BSA (m/v) in TBS-T, or anti-GAPDS (rabbit polyclonal antibody, ABCAM, #AB153802, 1:500) diluted in blocking solution containing 5% fat-free milk (m/v). Membranes were either incubated overnight at 4°C (anti-pY) or for 2 h at room temperature (anti-pThr, anti-pSer, pPKAs, and GAPDS), following incubation with appropriated secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, immunoreactive bands were detected with Supersignal West Femto Max Imum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, #34095). Membranes were incubated with stripping solution to remove antibody binding from the previous western blot and then were used again with other antibodies. To check nonspecific binding, we performed western blot with absence of primary antibody. Western Blot images were analyzed using ImageJ software [26] for pixel quantification of target phosphoprotein bands (~75 kDa) and phosphohexokinase (~116 kDa), used as endogenous

control. Results were expressed as arbitrary units (AU).

Acrosomal reaction assay

A pool of spermatozoa (1.2×10^6 cells) was diluted in a 200 μ L capacitated TYH medium in the presence or absence of anti-EPPIN Q20E, F15C and S21C antibodies to promote sperm capacitation for 60min. After sperm capacitation, one aliquot of each group was exposed to calcium ionophore A23187 [(5 μ M final), Sigma] to induce AR or exposed to DMSO (control) for 30min at 37°C (5%/ 95% CO₂/air). Other aliquot given no treatment (spontaneous). Next, the samples were fixed using 2% paraformaldehyde (1 mL) for 4min at room temperature (RT) and centrifuged 500 x g for 3min at RT. Pellets were resuspended in PBS pH 7.4 (1mL) centrifuged 500 x g for 3min at RT. We remove the supernatant and the pellet were resuspended in 50 μ L of PBS. Next, we performed a smear of sperm sample (50 μ L) and waited to dry. The slides prepared, were washed with distilled water for 5min. Following, were incubated with methanol pre-cooled for 5min. Then, the slides were washed again with distilled water for 5min and incubated with coomassie solution (0.22% Coomassie brilliant blue, 50% methanol; 10% acetic acid; 40% distilled water) for 2min. Finally, we washed the slides until remove coomassie blue solution. At least 200 spermatozoa were counted in each slide and the percentage of acrosome reacted and acrosome intact cells were evaluated. Coomassie Brilliant Blue staining in reacted and intact acrosome of spermatozoa can be seen in Supplementary Fig.S4.

In vitro fertilization

A pool of spermatozoa (0.1×10^6 cells) was diluted in 200 μ L KSOMaa (95 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.35 mM KH₂PO₄, 0.2 mM MgSO₄, 0.2 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 1.7 mM CaCl₂, 0.2 mM sodium pyruvate, 10 mM sodium lactate, 0.01 mM EDTA, 1 mM L-glutamine, containing 0.6% BSA – w/v, 1% minimal essential medium essential amino acids and 0.5% non-essential amino acid – v/v) droplets in the absence or presence of normal rabbit IgG (control), Q20E, F15C or S21C antibodies (0.1 mg/ml). The sperm suspension was covered with pre-heated embryo-tested mineral oil and incubated for 60 min in 5% CO₂, under saturated humidity at 37°C.

CB6F1 females were superovulated with 5 IU eCG and 5 IU hCG by intraperitoneal injection 48 h apart. Fifteen hours after hCG injection, females were euthanised and their oviducts (ampulla) containing complexes oocyte cumulus (COCs) were collected in KSOMaa. We then dissected and plated the COCs in KSOMaa and transferred them (20-40 COCs) to the fertilization droplets containing spermatozoa capacitated in the absence or presence of normal rabbit IgG, Q20E, F15C or S21C antibodies previously. The fertilization plate was then incubated for 6 h in 5% CO₂, under saturated humidity at 37 °C. After IVF, COCs were denuded by gentle pipetting and presumptive zygotes were washed in KSOMaa and incubated in fresh KSOMaa in 5% CO₂, under saturated humidity at 37 °C. After 24 h of incubation, two-cell embryos were counted as the parameter of IVF efficiency (cleavage rate). The cleavage rate was evaluated as the ratio of count of two-cell embryos to the number of incubated COCs.

In silico prediction of EPPIN phosphorylation

We submitted the human and murine EPPIN protein sequences to analysis of putative phosphorylation sites using five online softwares: i) GPS Web Server [33] a platform that predicts serine, threonine, and tyrosine phosphorylation, identifies the cognate kinases and classifies them hierarchically into four levels: group, family, subfamily and the name of protein kinase; ii) NetPhos 3.1 [28], a platform that predicts serine, threonine, and tyrosine phosphorylation using ensembles of neural networks; iii) KinasePhos 2.0 [35], a platform that predicts the catalytic kinase-specific phosphorylation site; iv) pKaPS [36], a platform that identifies putative PKA phosphorylation sites using a simplified kinase binding model ; v) ScanSite 4.0[37], a platform that predicts residues subjected to phosphorylation by identifying short protein sequence motifs that are recognized by modular signaling domains phosphorylated by protein kinases. We considered positive hits residues predicted as a substrate for protein kinases in at least three softwares with scores above 0.5. A medium to high threshold was considered for analysis, except for ScanSite software, where were considered a low threshold, but only the residues already predicted in other platforms were considered in this case.

Statistical analysis

Results were expressed as mean and $\pm$ standard error of the mean (SEM). We submitted the data to the F test for homoscedasticity analysis. Percentage data were transformed to arcsine square-root before statistical analysis. We performed one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tuckey or Bonferroni post-tests. We considered significant the differences associated with the probability $p < 0.05$. We performed statistical analyses using GraphPad Prism[®] 6.0 software (GraphPad Software Inc.).

RESULTS

Capacitation induced a time-dependent increase in tyrosine and serine/threonine phosphorylation in mouse spermatozoa

To confirm the effects induced by *in vitro* capacitation in phosphoprotein profile in mouse spermatozoa, we incubated sperm samples under capacitating conditions and evaluated tyrosine and serine/threonine phosphorylation after 30, 60, and 120 min of capacitation by Western blot. We identified low levels of tyrosine and serine/threonine phosphorylation in non-capacitated samples (Figure 1A-C). On the other hand, we observed a time-dependent increase in tyrosine phosphorylation of proteins ranging from ~25 to ~100 kDa (Figure 1A). The intensity of phosphotyrosine-positive bands increased over time, reaching maximum levels between 60 and 120 min. In addition, we detected a constitutive phosphotyrosine protein band at ~116 kDa, which was already present in non-capacitating control (Figure 1A). The identity of this ~116 kDa protein corresponds to phosphohexokinase, which is known to be constitutively phosphorylated in mouse spermatozoa in a capacitation-independent manner [32,33].

Similarly, we detected a time-dependent increase in serine/threonine protein phosphorylation ranging from ~25 kDa to ~120 kDa (Figure 1B-C). The intensity of phosphoserine- and phosphothreonine-positive bands also reached maximum levels between 60 and 120 min (Figure 1B-C). Altogether, our results confirm the time-dependent induction of phosphorylation of sperm proteins during capacitation. Given the intensity of the signal detected in our Western blot assays, we performed further studies using only spermatozoa incubated for 120 min under capacitating conditions.

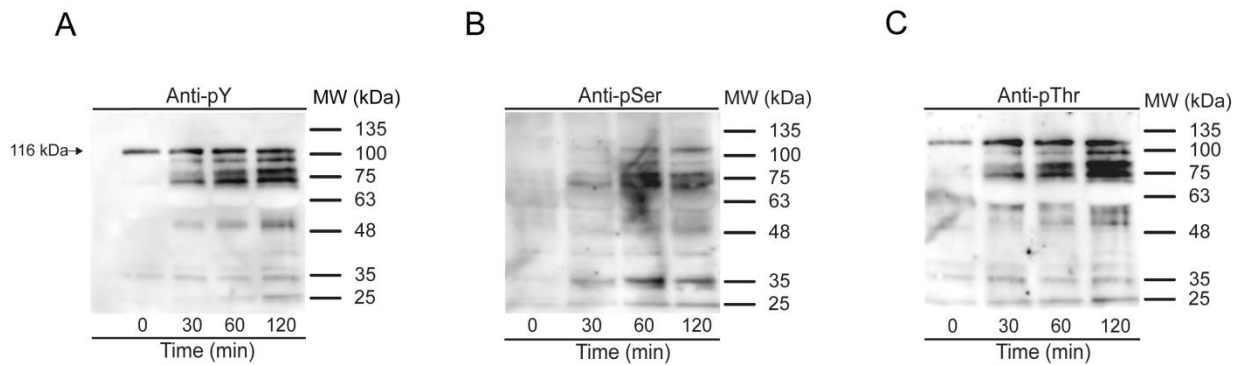


Figure 1. Time-course of capacitation-induced tyrosine and serine/threonine phosphorylation in mouse sperm proteins. Detection of phosphotyrosine (A), phosphoserine (B) and phosphothreonine (C) residues by Western blot using total protein extracts from mouse spermatozoa at different time-points after inducing capacitation. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis of adult mice in noncapacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, time 0) or incubated under capacitating conditions for 30, 60 and 120 min in TYH medium supplemented with NaHCO_3 and BSA at 37°C (5% $\text{CO}_2/95\%$ air). Membranes were probed with anti-pY (A), anti-pSer (B), and anti-pThr (C) antibodies. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Arrow indicate phosphohexokinase immunoreactive band of ~ 116 kDa. Results are representative of 3-4 independent experiments.

Blocking epitopes in EPPIN WFDC and Kunitz domains did not change capacitation induced tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa

In order to investigate whether EPPIN WFDC and Kunitz domains play roles in capacitation-induced sperm protein phosphorylation, we incubated spermatozoa in capacitating conditions in the presence of increasing concentrations (10, 100 and 300 $\mu\text{g/ml}$) of anti-EPPIN antibodies mapping different epitopes in either domain (Table 1, Supplementary Figure S1). Incubation of spermatozoa with normal rabbit IgG, used as control, did not change tyrosine and serine/threonine phosphorylation during sperm capacitation compared to capacitated (CAP) control (Supplementary Figure 2A).

Regarding Q20E and F15C antibodies, which recognize epitopes in the EPPIN WFDC domain, we observed no changes in the phosphotyrosine protein profile compared to IgG and CAP controls at any concentration analyzed (Figure 2A-B). Densitometric analysis of immunoreactive phosphotyrosine protein bands at ~ 75 kDa, normalized to the phosphohexokinase band, further confirmed the similar capacitation-induced tyrosine phosphorylation profile among Q20E- and F15C-treated groups and controls (Figure 2A-B). Similar results were obtained when sperm samples were incubated with S21C antibody (Figure 2C).

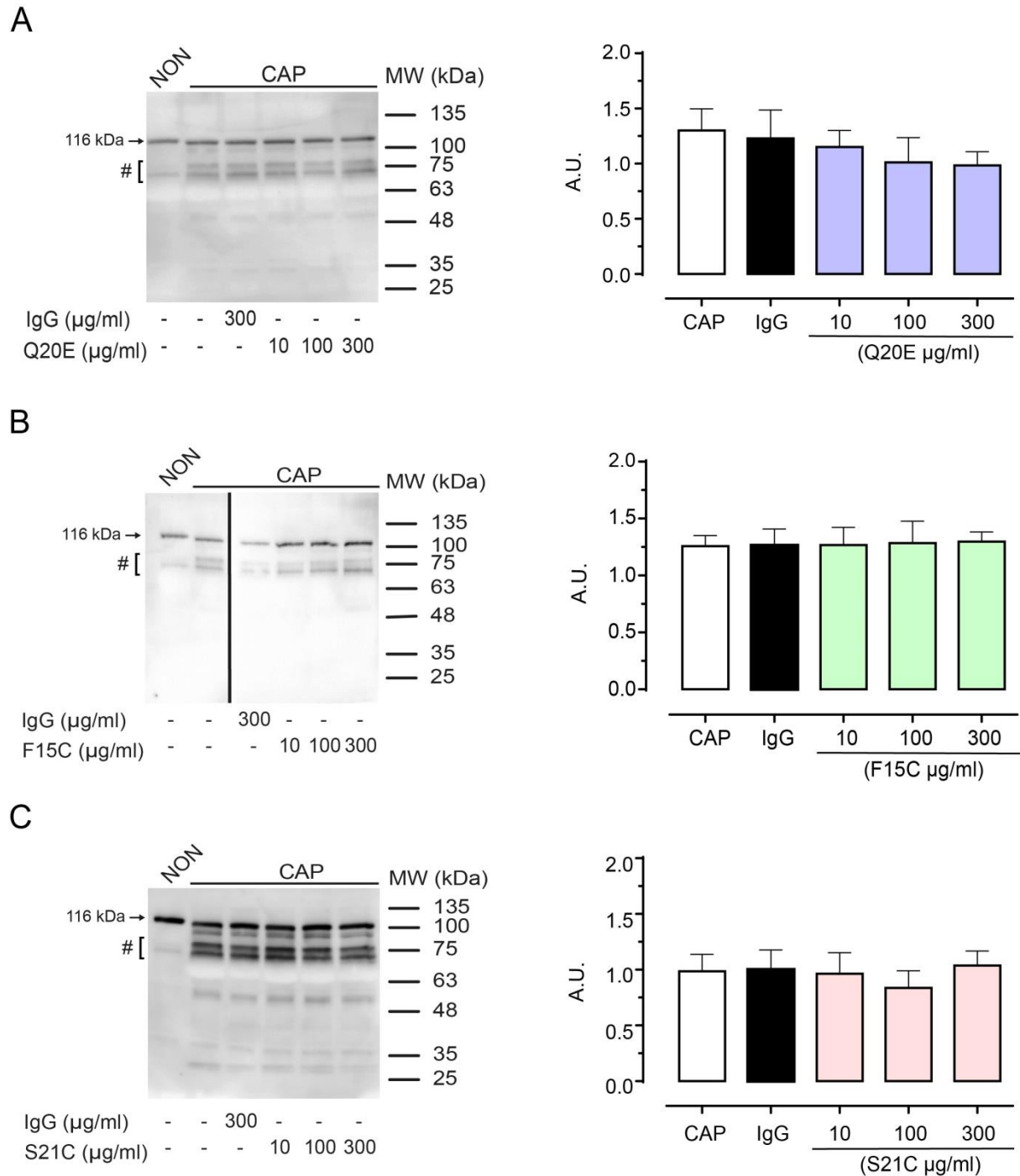


Figure 2. Effects of anti-EPPIN antibodies on capacitation-induced tyrosine phosphorylation in sperm proteins. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the presence of increasing concentrations (10, 100 and 300 $\mu\text{g/ml}$) of Q20E (A), F15C (B) and S21C (C) antibodies. Membranes were probed with anti-pY primary antibody. All experiments were analyzed using ImageJ and pixels for each lane at the double band ~ 75 kDa (#) were quantified using phosphohexokinase (arrow) bands as endogenous control. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Values in arbitrary units were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=5-6$ independent experiments.

Blocking epitopes in EPPIN WFDC and Kunitz domains differentially modulated capacitation induced serine/threonine phosphorylation in mouse spermatozoa

Next, we evaluated whether anti-EPPIN Q20E, F15C and S21C antibodies change phosphoserine and phosphothreonine profiles during sperm capacitation. We observed no changes in capacitation-induced phosphoserine and phosphothreonine phosphorylation in IgG and CAP controls (Supplementary Figure 2B-C). Given that all antibodies tested were produced in rabbits, we observed two non-specific bands at ~55 and ~25 kDa, which correspond to IgG heavy and light chains, respectively, recognized by anti-rabbit secondary antibody (Supplementary Figure 3).

Both Q20E and F15C antibodies did not change capacitation-induced serine phosphorylation compared to IgG and CAP controls at any concentration analyzed (Figure 3A-B). We observed similar results when phosphothreonine profile was evaluated (Figure 4A-B). S21C antibody did not affect phosphoserine and phosphothreonine sperm protein levels in capacitated samples (Figures 3C and 4C). It is worth noting that densitometry analysis revealed that 300 µg/ml S21C antibody induced a ~1.7 and ~1.8 increase in the intensity of phosphoserine and phosphothreonine protein bands at ~75 kDa in comparison to IgG control (Figures 3C and 4C).

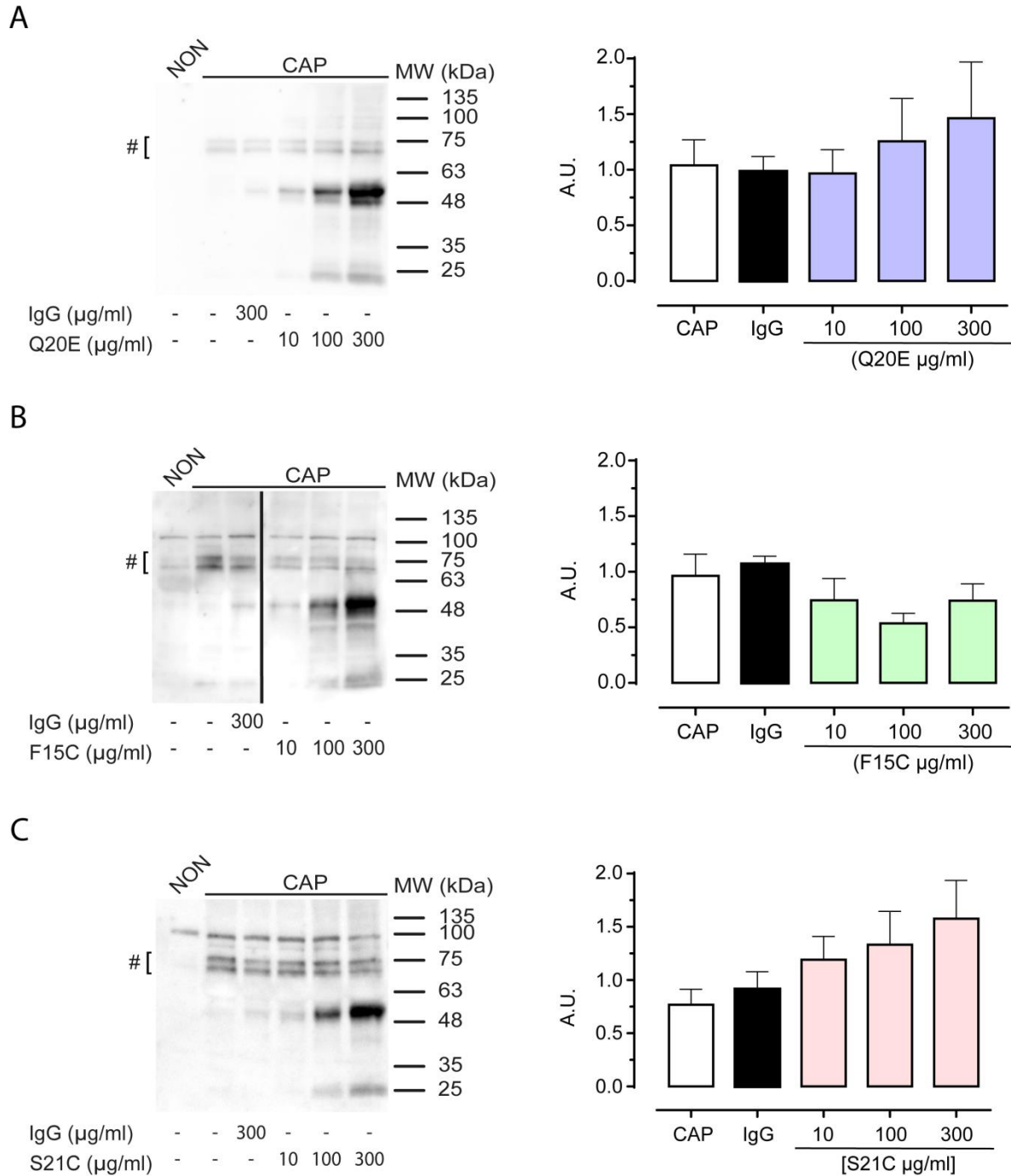


Figure 3. Effects of anti-EPPIN antibodies on capacitation-induced serine phosphorylation in sperm proteins. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% $\text{CO}_2/95\%$ air (capacitating condition, CAP) in the presence of increasing concentrations (10, 100 and $300 \mu\text{g/ml}$) of Q20E (A), F15C (B) and S21C (C) antibodies. Membranes were probed with anti-pSer primary antibody. All experiments were analyzed using ImageJ and pixels for each lane at the double band ~ 75 kDa (#) were quantified using phosphohexokinase bands (~ 116 kDa; see Figure 2) as endogenous control. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Values in arbitrary units were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=3-6$ independent experiments.

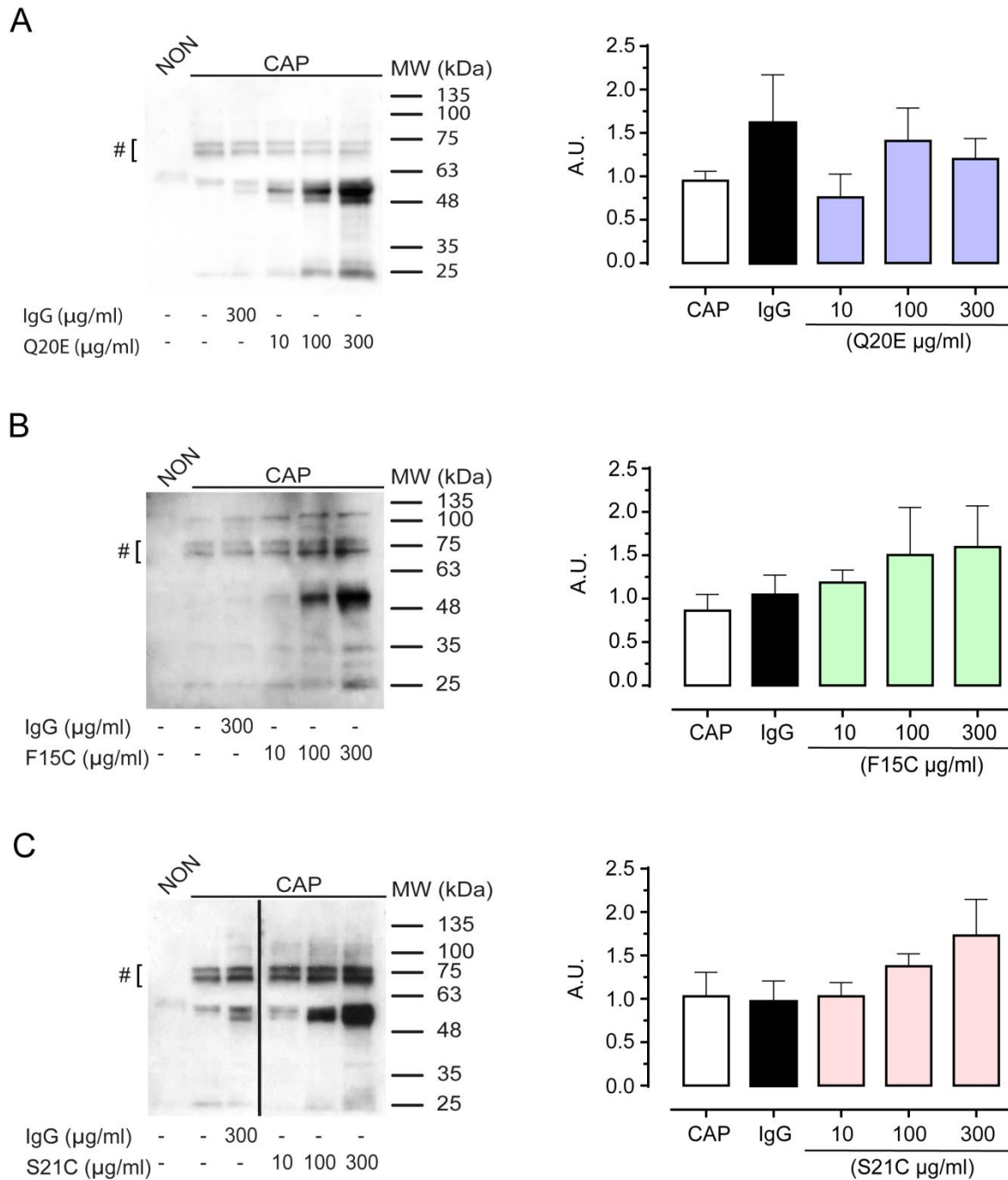


Figure 4. Effects of anti-EPPIN antibodies on capacitation-induced threonine phosphorylation in sperm proteins. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the presence of increasing concentrations (10, 100 and 300 µg/ml) of Q20E (A), F15C (B) and S21C (C) antibodies. Membranes were probed with anti-pThr primary antibody. All experiments were analyzed using ImageJ and pixels for each lane at the double band ~ 75 kDa (#) were quantified using phosphohexokinase bands (~ 116 kDa; see Figure 2) as endogenous control. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Values in arbitrary units were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=3$ independent experiments.

Given that PKA, a serine/threonine kinase, activation is a crucial signaling event during sperm capacitation, we evaluated whether anti-EPPIN antibodies affected the levels of

phospho-PKA substrates in capacitating spermatozoa. We observed an increase in phospho-PKA substrate levels as early as 5 min after sperm incubation under capacitating conditions compared to non-capacitated sample; high phospho-PKA substrate levels were sustained after 30, 60, and 120 min of capacitation. Incubation of mouse spermatozoa in the presence S21C antibody Fab fragment (300 µg/ml) resulted in increased levels of phospho-PKA substrates in comparison to control (normal rabbit IgG Fab fragment) (Figure 5). Conversely, Q20E antibody Fab fragment did not affect PKA-dependent protein phosphorylation (Figure 5).

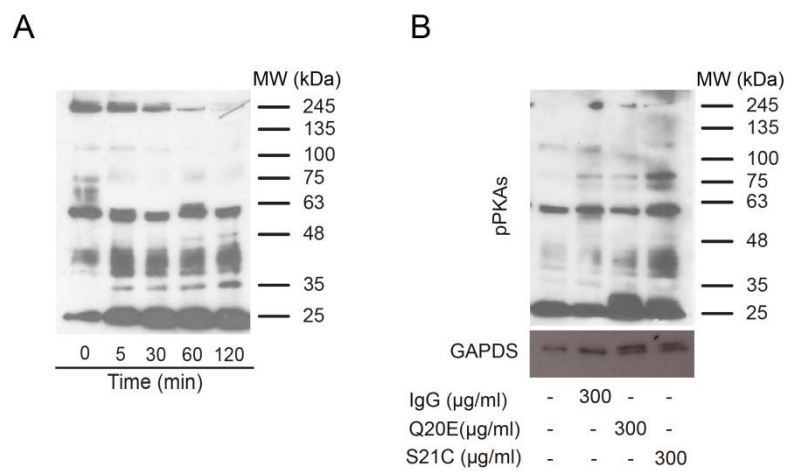


Figure 5. Effects of anti-EPPIN antibodies on PKA activation. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO₃ and BSA at 37°C 5% CO₂/95% air (capacitating condition, CAP) in the presence of 300µg/ml of Q20E (Fab) and S21C (Fab) antibodies. Membranes were probed with anti-pPKAs primary antibody. GAPDS was used as endogenous control. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Results are representative of n=3-4 independent experiments.

Recombinant SVS2 (rSVS2) inhibited capacitation-induced tyrosine and serine/threonine phosphorylation in mouse spermatozoa

To investigate the underlying mechanisms by which SVS2 modulates sperm capacitation, we incubated sperm samples in capacitating conditions in the absence or presence of increasing concentrations of rSVS2 (1, 10, and 25 µM). rSVS2 inhibited capacitation-induced protein phosphorylation in a concentration-dependent manner (Figure 6). We observed that spermatozoa treated with 25 µM rSVS2 displayed a reduction in phosphotyrosine protein bands at ~75 kDa ($p = 0.008$) in comparison to CAP control (Figure 6A). Interestingly, we found that 25µM rSVS2 also promoted a decrease in the constitutive

phosphorylation of hexokinase ($p = 0.028$), which prevented its use as an endogenous control in our densitometry analysis (Figure 6A). rSVS2 further inhibited capacitation-induced serine phosphorylation at 10 and 25 μM ($p = 0.02$ and 0.002 , respectively) (Figure 6B). Similar results were obtained when the phosphothreonine profile was evaluated (Figure 6C).

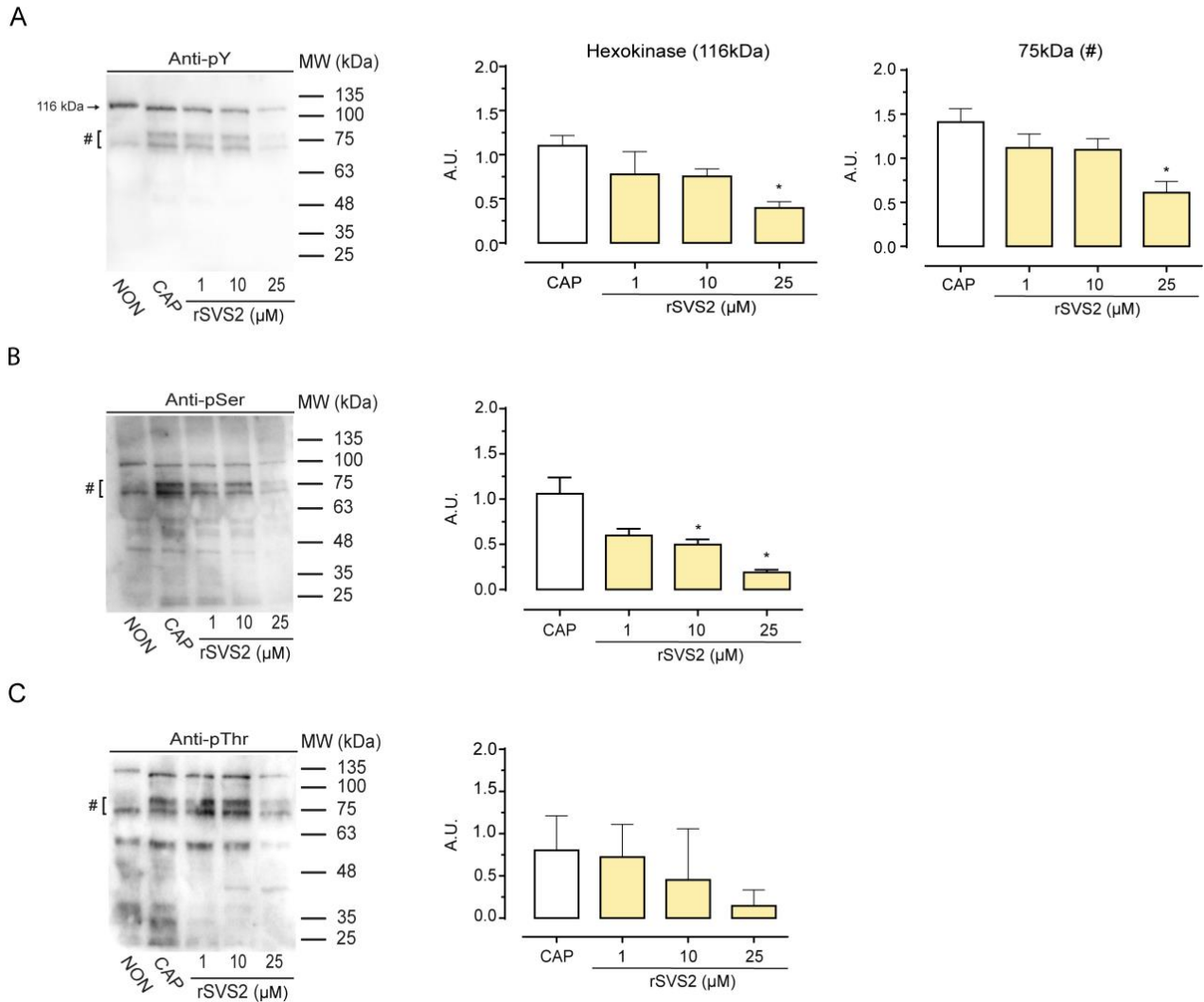


Figure 6. Effects of rSVS2 on capacitation-induced tyrosine and serine/threonine phosphorylation in sperm proteins. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the absence or presence of increasing concentrations (1, 10 and 25 μM) of rSVS2. Membranes were probed with anti-pTyr (A), anti-pSer (B) and anti-pThr (C) primary antibodies. All experiments were analyzed using ImageJ and pixels corresponding to phosphohexokinase (~ 116 kDa) and ~ 75 kDa bands (#) were corrected using phosphohexokinase from ~ 116 kDa band of non-capacitating group. MW indicates a standard protein ladder (kDa). Values in arbitrary units were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=2-3$ independent experiments. Asterisks indicate $p < 0.05$ (ANOVA followed by Tukey test).

Blocking epitopes in EPPIN WFDC and Kunitz domains change capacitation-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa

To explore the involvement of EPPIN WFDC and Kunitz domains in spontaneous and induced acrosome reaction, we incubated sperm samples in capacitating conditions in the absence or presence of two concentrations of Q20E, F15C, and S21C (10 and 300 µg/ml). No significant effect of Q20E, F15C, and S21C antibodies was observed on spontaneous acrosome reaction in any concentration of antibodies (Figure 7A-C).

The co-incubation with A23187 after capacitation promoted a 2-fold increase in the acrosome reaction rates of control samples compared with the spontaneous rate. When spermatozoa were incubated with anti-EPPIN Q20E and S21C antibodies, the percentage of AR induced by A23187 was not changed (Fig. 7A and C). At the concentration of 300 µg/ml, the F15C antibody increased the percentage of A23187 induced AR ($p=0.0272$) compared with control [CAP] (Figure 7B). Normal rabbit IgG antibody did not affect spontaneous and A2318-induced AR.

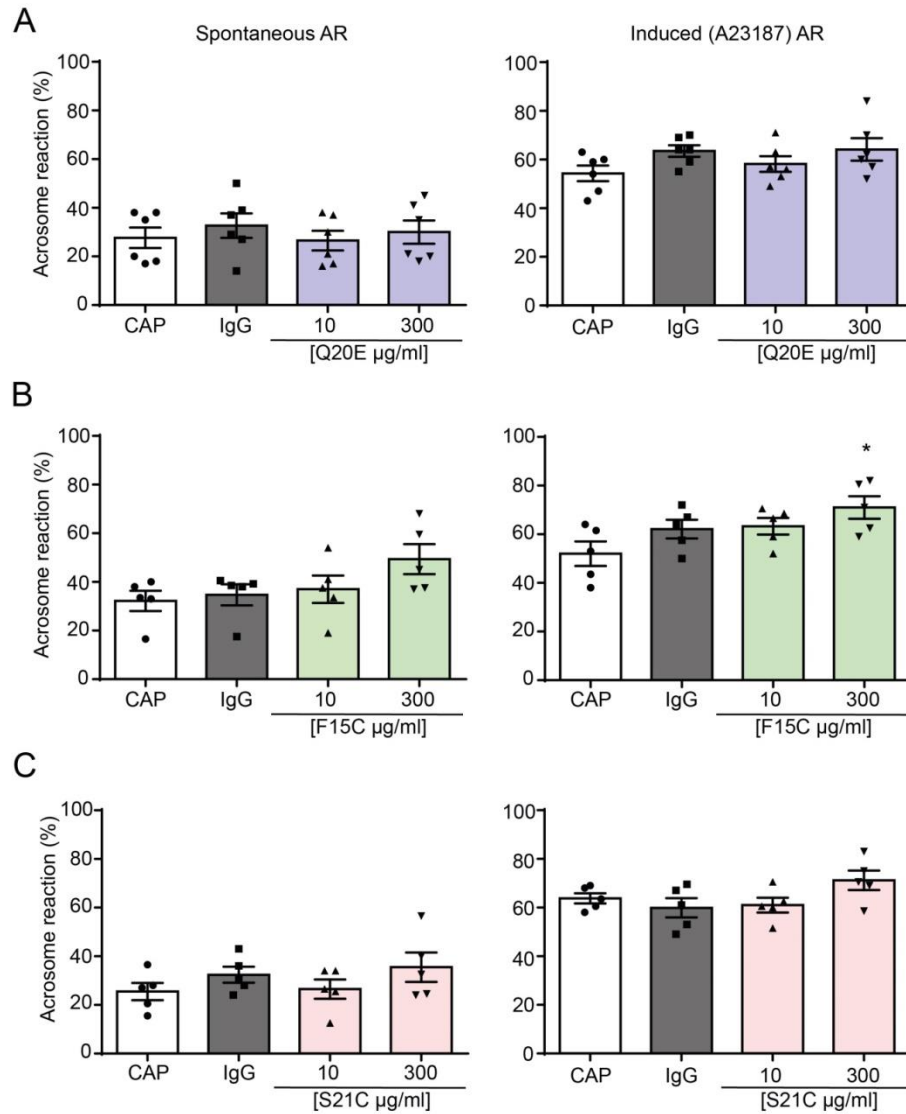


Figure 7. Effects of anti-EPPIN antibodies on spontaneous and A23187-induced AR. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (1.2×10^6 cells/ml) were incubated under capacitating conditions for 60 min in supplemented medium with NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the presence or absence of two concentrations (10 and 300 $\mu\text{g/ml}$) of anti-EPPIN Q20E, F15C and S21C antibodies or normal rabbit IgG (control, 300 $\mu\text{g/ml}$). After capacitation, spontaneous samples were processed immediately. Induced samples were stimulated for 30 min with A23187. (A) Capacitated spermatozoa without A23187 (spontaneous) or stimulated for 30 min with A23187 in the absence or presence of Q20E antibody (10–300 $\mu\text{g/ml}$) or normal rabbit IgG (300 $\mu\text{g/ml}$). (B) Capacitated spermatozoa without A23187 (spontaneous) or stimulated for 30 min with A23187 in the absence or presence of F15C antibody (10–300 $\mu\text{g/ml}$) or normal rabbit IgG (300 $\mu\text{g/ml}$). (C) Capacitated spermatozoa without A23187 (spontaneous) or stimulated for 30 min with A23187 in the absence or presence of S21C antibody (10–300 $\mu\text{g/ml}$) or normal rabbit IgG (300 $\mu\text{g/ml}$). Results were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=5-6$ independent experiments. Asterisks indicate $p < 0.05$ (ANOVA followed by Tukey test).

Blocking epitope on EPPIN Kunitz domain affect in vitro fertilization rates in mouse spermatozoa

To investigate whether the effects of anti-EPPIN antibodies on capacitation-associated parameters impact sperm function, we evaluated their effects on in vitro fertilization. The incubation of spermatozoa with normal rabbit IgG, used as a control, did not change the rates of in vitro fertilization rates compared to the capacitated control (CAP) since both samples yield similar rates of two-cell embryos (Figure 8). Conversely, spermatozoa incubated with S21C antibody (100 µg/ml) displayed decreased in vitro fertilization rates when compared to IgG control ($p=0.0241$) (Figure 8). No effect was observed upon incubation with anti-EPPIN Q20E and F15C antibodies (Figure 8).

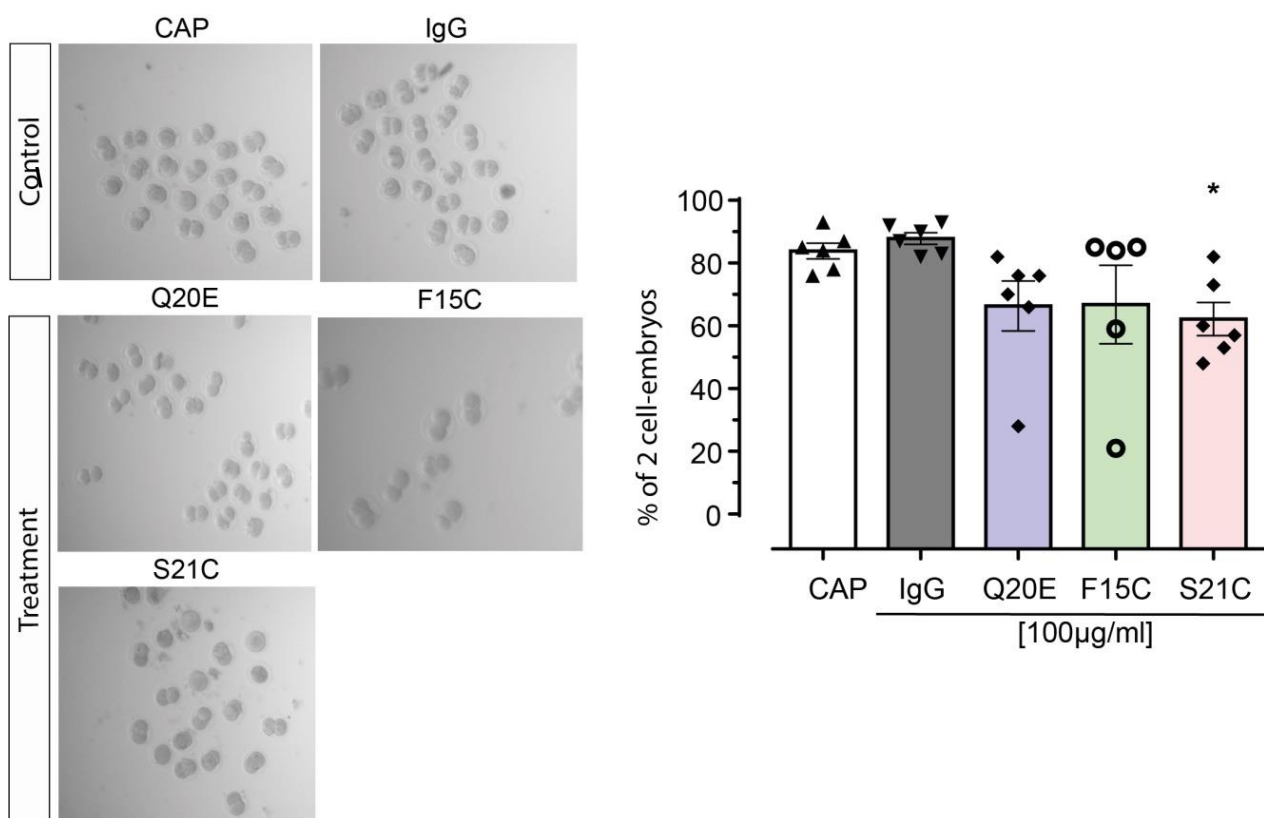


Figure 8. Effects of anti-EPPIN antibodies on in vitro fertilization rates. Spermatozoa were collected from the cauda epididymidis in TYH capacitating medium and 0.2×10^6 cells/ml was incubated under capacitating conditions for 60 min in KSOM AA medium at 37°C 5% CO₂ / 95% air to promote sperm capacitation. The sperm capacitation was performed in the presence or absence of 100µg / ml of anti-EPPIN Q20E, F15C and S21C antibodies or rabbit IgG, used as a control. Collected oocytes were incubated with capacitated spermatozoa (20-40 oocytes per group) in KSOM AA medium). In vitro fertilization was performed for 6 hours at 37°C 5% CO₂ / 95%. Co-incubation for culture was made for 24 hours to obtain two-cell embryos. Results were expressed as mean $\pm$ SEM, $n=5-6$ independent experiments. Asterisks indicate $p < 0.05$ (ANOVA followed by Bonferroni test).

EPPIN is a putative target for post-translational modifications

To evaluate whether EPPIN is a putative substrate of protein kinases, we submitted human and mouse EPPIN protein sequences to different phosphorylation prediction platforms (GPS Web Server, NetPhos 3.1 Server, KinasePhos, pkaPS and ScanSite 4.0). We observed that C-terminal serine residues S¹¹⁹, S¹²¹ and S¹³² of mouse EPPIN were predicted to be subject to phosphorylation by kinases in at least three platforms tested (Table 2). Protein kinase A (PKA) and DNA-dependent protein kinase (DNAPK) were the most prevalent cognate kinases identified (Table 2). Regarding human EPPIN, C-terminal serine residue S¹¹⁹ was also predicted to be a substrate for protein kinases (Table 2). Residue S¹¹⁹ is conserved in human and mouse EPPIN (Table 2, Supplementary Figure S1). In addition, threonine residue T¹²⁶ was predicted as a substrate of protein kinases by three platforms. Both human EPPIN S¹¹⁹ and T¹²⁶ residues were identified as substrates of the cognate kinases PKA, as well as protein kinase C isoforms (PKC and PRKCH) and NIMA-related kinase 2 and 9 (NEK2 and NEK9) (Table 2).

Table 2: Predicted sites and kinases in silico of human and murine EPPIN.

Predicted site		Method [Score (Kinase)]				
	Residues	GPS	PKAps	NetPhos	Kinasephos	ScanSite
Mouse	S119*	0.7	-	0.6	-	0.6
		(DNAPK)	-	(DNAPK)	-	(DNAPK)
	S121	4.6	-	-	1.7	0.9
		(PDHK)	-	-	(IKK)	(PDK1)
	S132	37.5	1.3	0.7	-	0.5
		(TKL)	(PKA)	(PKA)	-	(PKA)
Human	S119*	2.1	-	0.52	-	0.7
		(NEK2)	-	(PKA)	-	(NEK9)
	T126	3.1	-	0.8	-	0.5
		(PRKCH)	-	(PKC)	-	(NEK9)

*Residue conserved in human and murine EPPIN. DNAPK (protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit) identified as PRKDC in *Mus musculus*; PDHK; IKK (kinase complex); PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1); TKL (TXK tyrosine kinase) identified as TXK in *Mus musculus*; PKA (cAMP-dependent protein kinase); NEK2 (NIMA related kinase 2); NEK9 (NIMA related kinase 9); PRKCH (protein kinase C eta); PKC (protein kinase C).

DISCUSSION

Male contraceptive strategies acting on post-testicular events have the advantage of inducing a fast-onset reversible inhibition of male fertility, thus allowing on-demand use [17]. Events associated with sperm capacitation, such as protein phosphorylation, hyperactivation, and acrosomal exocytosis are promising sources of targets for pharmacological interventions that render spermatozoa dysfunctional and unable to fertilize the egg [34]. In this context, EPPIN is a sperm drug target for male contraception due to its pivotal role in controlling sperm function. After ejaculation, EPPIN serves as a sperm surface docking site for SEMG1, a seminal plasma protein that inhibits sperm motility and capacitation-associated events [10,14,35]. Thus, understanding whether EPPIN plays a role in sperm capacitation will expand the potential mechanisms by which it may be explored as a male contraceptive drug target.

Here, we showed that endogenous and exogenous EPPIN-binding molecules display differential effects on capacitation-induced phosphotyrosine, phosphoserine, phosphothreonine, and PKA substrate profiles in mouse spermatozoa. The EPPIN-binding partner SVS2, the mouse ortholog to human SEMG1, inhibited sperm protein phosphorylation events during capacitation. However, anti-EPPIN antibodies did not modify the phosphoprotein profile, while PKA activity (indirectly measured through phospho-PKA substrate levels) was increased in the presence of the S21C antibody. In addition, we demonstrated that induced acrosome reaction rates were modified in the presence of F15C antibody, and the incubation with S21C antibody decreased *in vitro* fertilization ability. Our results provide new insights on EPPIN as an integrating element of signaling pathways modulating post-testicular sperm maturation events.

A myriad of post-translational protein modifications is known to occur during sperm capacitation [33,36,37]. Among them, tyrosine phosphorylation is considered an important event regulating downstream signaling pathways that promote sperm capacitation [25,33,34]. It is thought that capacitation-induced tyrosine phosphorylation is indirectly dependent on the activation of soluble adenylyl cyclase (ADCY10)/3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/PKA pathway [8,33,38]. PKA is one of the major serine/threonine kinase found in human and mouse spermatozoa, and its activation during sperm capacitation leads to serine/threonine phosphorylation in downstream target proteins, including tyrosine kinases such

as SRC [8,34,39]. Spermatozoa from PKA catalytic subunit alpha knock-out mice (*Pkaca*^{-/-}), which encodes the sperm-specific splice variant PKA-Cα2, showed no increase in tyrosine phosphorylation during capacitation [40]. Consistently, *Pkaca*^{-/-} mice are infertile due to the absence of capacitation-associated events, such as hyperactivated motility and other sperm motility defects [40]. Our results further confirmed the increase in tyrosine and serine/threonine phosphorylation in mouse spermatozoa during capacitation. Moreover, our findings demonstrated an increase in sperm phosphoproteins requires 60-120 min to reach maximum levels after incubation in capacitating conditions, which justified our choice to perform further analysis using spermatozoa capacitated within this time range.

Seminal plasma proteins are known to regulate the function of spermatozoa after ejaculation, including progressive motility and capacitation, thus playing crucial roles in reproduction [12]. These proteins usually achieved their functions by establishing protein-protein interaction networks with sperm proteins. For instance, SEMG1 is part of a multiprotein complex containing EPPIN, clusterin, and lactotransferrin (known as EPPIN protein complex; EPC) on the surface of human ejaculate spermatozoa [41]. SEMG1/EPPIN interaction in the EPC results in inhibition of sperm progressive motility [5,11] and capacitation [10], but also provides antimicrobial protection [42–44] while promoting sperm survival in the female reproductive tract [49,51]. Consistent with these findings, we recently showed that the seminal plasma protein SVS2 binds EPPIN to form a large protein-protein complex and other SVS (SVS3A, SVS5, and SVS6) proteins in mouse spermatozoa [26].

Both SEMG1 and SVS2 belong to the rapidly-evolving seminal vesicle transcribed (REST) family. SVS2 is the major seminal plasma protein in mice and plays similar roles to human SEMG1 on the regulation of sperm function [22]. Upon binding to spermatozoa, SVS2 inhibits the initiation of capacitation and reduces the fertility of capacitated spermatozoa (decapacitation effect) [28,52]. Similar to SEMG1, studies demonstrated that SVS2 inhibits sperm tyrosine phosphorylation, acrosomal exocytosis and reduces in vitro fertilization rates in mice [22]. Our results showed the inhibitory effects of rSVS2 on capacitation-induced tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation, indicating its ability to inhibit different types of protein kinases. Moreover, rSVS2 effects on protein phosphorylation profile also included the

dephosphorylation of proteins, such as hexokinase, which is constitutively phosphorylated in mouse spermatozoa and typically detected in Western blot using anti-pY antibody [32,47]. This scenario suggests that SVS2 could promote the inhibition of protein kinases in parallel with the activation of protein phosphatases.

In contrast to protein kinases, protein phosphatases remove a phosphate group from the hydroxyl group of serine, threonine or tyrosine residues [48]. Studies showed that different phosphatases, including serine/threonine phosphatases, play important roles in sperm capacitation [36,49]. For instance, members of the serine/threonine-specific phosphoprotein phosphatase (PPP) family, such as calcineurin (PPP3), are involved in the regulation of sperm motility, acrosomal exocytosis as well as capacitation-induced tyrosine phosphorylation [50,51]. In line with these observations, pharmacological inhibition of serine/threonine phosphatases reverted rescued protein phosphorylation inhibition in spermatozoa treated with c-Src tyrosine kinase inhibitors [49]. Interestingly, in silico analysis identified that PP1 α 2, a sperm-specific protein phosphatase 1 (PP1) isoform, interacts with SEMG1 in a large protein network [52], suggesting that seminal plasma proteins may modulate the activity of protein phosphatases in spermatozoa. The mechanisms and physiological relevance of SEMG1-mediated regulation of protein phosphatases in spermatozoa, however, remain unclear. Based on these findings, we hypothesize that SEMG1 and SVS2 are functionally conserved in regulating events associated with capacitation upon binding EPPIN on the sperm surface.

To evaluate this hypothesis further, we decided to investigate whether anti-EPPIN antibodies could modify the course of capacitation-induced protein phosphorylation in mouse spermatozoa. Previous studies demonstrated that sequence C¹⁰²-P¹³³ in the EPPIN C-terminal region, part of the Kunitz domain, contains the SEMG1 binding surface [53]. Anti-EPPIN S21C antibody, which targets a sequence within the EPPIN Kunitz domain, inhibits motility parameters of both human [10] and mouse spermatozoa (Silva et al., unpublished data), providing the grounds for the development of EPPIN as a contraceptive drug target. Moreover, anti-EPPIN antibodies to full-length human EPPIN (residues 10-110) inhibited calcium ionophore A23187-induced acrosome reaction in human spermatozoa, indicating that blocking EPPIN could affect intracellular calcium levels required for capacitation [16,21]. However, no changes in tyrosine

phosphorylation of sperm proteins during capacitation in the presence of anti-EPPIN antibodies were detected [21]. To provide a more comprehensive analysis on the involvement of EPPIN in sperm protein phosphorylation during capacitation, we incubated capacitating spermatozoa with three anti-EPPIN antibodies that mapping epitopes in WFDC (Q20E and F15C antibodies, residues Q²⁰-E³⁹ and F²⁹-Q⁴³, respectively) and Kunitz (S21C, residues S¹⁰³-C¹²³) domains of EPPIN. Our results showed that these anti-EPPIN antibodies did not affect tyrosine phosphorylation profiles during sperm capacitation.

On the other hand, we detected an increase in the abundance of capacitation-induced serine/threonine protein phosphorylation in spermatozoa incubated with the S21C antibody, although densitometric analysis revealed no significant difference to the control group. To investigate whether this effect could be mediated through modifications in PKA activation, we evaluated the impact of S21C and Q20E Fab fragments on phospho-PKA substrate levels during sperm capacitation. Our results showed increased levels of phospho-PKA substrates in samples incubated with S21C Fab antibody, suggesting its effects in sperm serine/threonine phosphorylation during capacitation are mediated by PKA. Consistent with these findings, cAMP accumulation was observed in human spermatozoa exposed to S21C antibody [14]. Intriguingly, S21C-induced increased cAMP production was associated with poor sperm motility outcomes [54], indicating that blocking the EPPIN Kunitz domain impaired the ability of spermatozoa to properly activate downstream targets of the ADCY10/cAMP/PKA pathway. Consistently with this hypothesis, our results showed that mouse spermatozoa exposed to the S21C antibody during capacitation displayed lower fertilization rates. Thus, the impairment of sperm function by the S21C antibody is likely to be mediated by disturbances on ADCY10/cAMP/PKA pathway. This interesting hypothesis warrants further investigation.

Changes in sperm capacitation can affect aspects of sperm function, including their ability to undergo acrosome reaction. We observed that the percentage of spermatozoa spontaneous or calcium ionophore-induced acrosome reacted increased after sperm capacitation reaching levels different from controls after 1h of incubation (data not showed). Spontaneous acrosomal reaction did not change with the incubation of anti-EPPIN antibodies, consistent with other studies [21]. However, incubation with F15C antibody (300µg/ml) significantly increased the

rate of calcium ionophore A23187-induced acrosome reaction, suggesting that this EPPIN epitope may be involved in the elevation of intracellular calcium levels during the acrosomal reaction, differently of other anti-EPPIN antibodies. In fact, studies showed that calcium ionophore could promote PLC α activation and PKC activity, leading to an increase of [Ca²⁺]_i resulting in increased acrosome reaction rates[55].

Post-translational modifications, such as phosphorylation of sperm proteins could change their functions, thus contributing to capacitation. EPPIN is known to remain in capacitated spermatozoa [21], although whether it undergoes capacitation-associated post-translational modifications is unknown. Our findings show that C-terminal residues in human (S¹¹⁹ and T¹²⁶) and mouse (S¹¹⁹, S¹²¹, and S¹³²) EPPIN are putative targets for phosphorylation. It is worth noting that other proteins in the WDFC family are targets of protein phosphorylation pathways. For instance, phosphorylation of WFDC2 (HE4) by activation of MAPK signaling pathway was associated with an increase in tumor growth and invasion in mice [56]. Interestingly, all predicted residues are located in the EPPIN Kunitz domain, which is crucially involved in the regulation of sperm motility and to form a binding surface for EPPIN ligands with spermstatic activity [10,57]. The serine residue S¹¹⁹ was the only predicted residue conserved between human and murine EPPIN, although there was no convergence in cognate protein kinases targeting this residue. This difference is likely associated with differences in kinase activity involved in protein phosphorylation induced by capacitation between humans and mice. Thus, the impact of phosphorylation of EPPIN serine/threonine residues on its roles in sperm function is an interesting topic that warrants further investigation.

Our findings highlight the multifunctional aspects of EPPIN as a sperm surface hub for protein-protein interactions that modulate sperm function while protecting spermatozoa during their journey towards fertilization. The formation of a large protein complex involving EPPIN and seminal plasma proteins members of the REST family is likely to be a crucial event for fertility in both humans and mice since it could prevent premature and ectopic sperm capacitation. Altogether, these observations contribute to expanding the potential mechanisms by which EPPIN may be explored as a non-hormonal male contraceptive drug target.

REFERENCES

- [1] O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22:289–318.
- [2] Hinton B, Robaire B. The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Volume 1, vol. 1. 2015:691–771.
- [3] Gervasi MG, Visconti PE. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol Reprod Dev* 2016; 83:860–874.
- [4] Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol* 2008; 52:511–522.
- [5] Kim K-S, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm ☆. *Dev Biol* 2003; 264:141–152.
- [6] Buffone MG (ed.). *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer International Publishing; 2016.
- [7] Clauss A, Lilja H, Lundwall A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:383–389.
- [8] Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod* 2011; 17:524–538.
- [9] Eddy EM. CHAPTER 1 - The Spermatozoon Gamete Biology Section, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina. In: Neill JD (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press; 2006:3–54.
- [10] Abou-haila A, Tulsiani DRP. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 2009; 485:72–81.
- [11] Tulsiani D. *Introduction to Mammalian Reproduction*. 2003.
- [12] O'Rand MG, Widgren EE, Wang Z, Richardson RT. Eppin: an effective target for male contraception. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250:157–162.
- [13] Ananthakumara P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. *Biol Reprod* 2020; 103:411–426.
- [14] Baker MA, Smith ND, Hetherington L, Pelzing M, Condina MR, Aitken RJ. Use of titanium dioxide to find phosphopeptide and total protein changes during epididymal sperm maturation. *J Proteome Res* 2011; 10:1004–1017.
- [15] Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:245–259.
- [16] O'Rand MG, Widgren EE. Loss of Calcium in Human Spermatozoa via EPPIN, the Semenogelin Receptor1. *Biol Reprod* 2012; 86.
- [17] Mitra A, Richardson RT, O'Rand MG. Analysis of Recombinant Human Semenogelin as an Inhibitor of Human Sperm Motility1. *Biol Reprod* 2010; 82:489–496.
- [18] de Lamirande E, Yoshida K, Yoshiike TM, Iwamoto T, Gagnon C. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J Androl* 2001; 22:672–679.
- [19] de Lamirande E, Lamothe G, Villemure M. Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:1420–1427.
- [20] O'Rand MG, Widgren EE, Beyler S, Richardson RT. Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: effect on cyclic adenosine monophosphate. *Biol Reprod* 2009; 80:279–285.
- [21] Zhang J, Ding X, Bian Z, Xia Y, Lu C, Wang S, Song L, Wang X. The effect of anti-eppin antibodies on ionophore A23187-induced calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2010; 25:29–36.
- [22] O'Rand MG, Widgren EE, Hamil KG, Silva EJ, Richardson RT. Epididymal Protein Targets: A Brief History of the Development of Epididymal Protease Inhibitor as a Contraceptive. *J Androl* 2011; 32:698–704.
- [23] O'Rand MG, Silva EJ, Hamil KG. Non-Hormonal Male Contraception: A Review and Development of an Eppin Based Contraceptive. *Pharmacol Ther* 2016; 157:105–111.

- [24] O'Rand MG, Hamil KG, Adevai T, Zelinski M. Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS One* 2018; 13:e0195953.
- [25] Silva EJ, Hamil KG, O'Rand MG. Interacting Proteins on Human Spermatozoa: Adaptive Evolution of the Binding of Semenogelin I to EPPIN. *PLoS ONE* 2013; 8.
- [26] Mariani NAP, Camara AC, Silva AAS, Raimundo TRF, Andrade JJ, Andrade AD, Rossini BC, Marino CL, Kushima H, Santos LD, Silva EJ. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2020; 506:110754.
- [27] Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:4145–4150.
- [28] Kawano N, Yoshida M. Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol Reprod* 2007; 76:353–361.
- [29] Shindo M, Inui M, Kang W, Tamano M, Tingwei C, Takada S, Hibino T, Yoshida M, Yoshida K, Okada H, Iwamoto T, Miyado K, et al. Deletion of a Seminal Gene Cluster Reinforces a Crucial Role of SVS2 in Male Fertility. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
- [30] Lundwall A. The cloning of a rapidly evolving seminal-vesicle-transcribed gene encoding the major clot-forming protein of mouse semen. *Eur J Biochem* 1996; 235:424–430.
- [31] Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, Vega-Beltran JLD, Ros VGD, Greer PA, Darszon A, Krapf D, Salicioni AM, et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development* 2016; 143:2325–2333.
- [32] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9:676–682.
- [33] Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics MCP* 2008; 7:1598–1608.
- [34] Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; 4:1633–1649.
- [35] Wong Y-H, Lee T-Y, Liang H-K, Huang C-M, Wang T-Y, Yang Y-H, Chu C-H, Huang H-D, Ko M-T, Hwang J-K. KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Res* 2007; 35.
- [36] Neuberger G, Schneider G, Eisenhaber F. pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol Direct* 2007; 2:1.
- [37] Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3635–3641.
- [38] Kalab P, Visconti P, Leclerc P, Kopf GS. p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J Biol Chem* 1994; 269:3810–3817.
- [39] Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121:1139–1150.
- [40] Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6.
- [41] O'Rand MG, Widgren EE, Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall SH, French FS, VandeVoort CA, Ramachandra SG, Ramesh V, Rao AJ. Reversible Immuncontraception in Male Monkeys Immunized with Eppin. *Science* 2004; 306:1189–1190.
- [42] Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod* 2013; 19:570–580.
- [43] Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of

- Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation. *Dev Biol* 1996; 180:284–296.
- [44] Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 1996; 55:684–692.
- [45] Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci J Virtual Libr* 2000; 5:E110-123.
- [46] Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, McKnight GS. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Ca_2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:13483–13488.
- [47] Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, Orand MG. Eppin: a molecular strategy for male contraception. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:535–542.
- [48] Edström AML, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwercman A, Mörgelin M, Cole AM, Sørensen OE. The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008; 181:3413–3421.
- [49] Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci CMLS* 1999; 55:944–960.
- [50] Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugam P, Wang Z, O'Rand MG, French FS, Hall SH. Antimicrobial Activity of Human EPPIN, an Androgen-Regulated, Sperm-Bound Protein with a Whey Acidic Protein Motif1. *Biol Reprod* 2004; 71:1484–1490.
- [51] Sakaguchi D, Miyado K, Iwamoto T, Okada H, Yoshida K, Kang W, Suzuki M, Yoshida M, Kawano N. Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
- [52] Kawano N, Yoshida K, Iwamoto T, Yoshida M. Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. *Biol Reprod* 2008; 79:1153–1159.
- [53] Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Dev Camb Engl* 1995; 121:1129–1137.
- [54] Han Y, Haines CJ, Feng HL. Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Arch Androl* 2007; 53:169–177.
- [55] Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2010; 285:7977–7985.
- [56] Castillo Bennett J, Roggero CM, Mancifesta FE, Mayorga LS. Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2010; 285:26269–26278.
- [57] Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* 2015; 350.
- [58] Silva JV, Freitas MJ, Santiago J, Jones S, Guimarães S, Vijayaraghavan S, Publicover S, Colombo G, Howl J, Fardilha M. Disruption of protein phosphatase 1 complexes with the use of biopptides as a novel approach to target sperm motility. *Fertil Steril* 2021; 115:348–362.
- [59] Silva EJ, Patrão MTCC, Tsuruta JK, O'Rand MG, Avellar MCW. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2012; 79:832–842.
- [60] de Lamirande E, Lamothe G. Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. *Hum Reprod Oxf Engl* 2010; 25:1619–1630.
- [61] Plessis SSD, Page C, Franken DR. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation. *Andrologia* 2001; 33:337–342.
- [62] Lu R, Sun X, Xiao R, Zhou L, Gao X, Guo L. Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility. *Biochem Biophys Res Commun*

- 2012; 419:274–280.
- [63] Silva EJR, Hamil KG, Richardson RT, O'Rand MG. Characterization of EPPIN's Semenogelin I Binding Site: A Contraceptive Drug Target. *Biol Reprod* 2012; 87.

Supplementary material for

Differential effects of EPPIN ligands on capacitation-associated events in mouse spermatozoa

Tamiris R. Fanti Raimundo¹, Noemia Aparecida P. Mariani¹, Alan Andrew S. Silva¹, Alexandre D. Andrade¹, Mariano G. Buffone², Fabíola F. P. Lopes³, Hélio Kushima¹, Marcelo T. Moura³, Erick J. R. Silva^{1*}.

¹*Department of Biophysics and Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu-São Paulo, Brazil.*

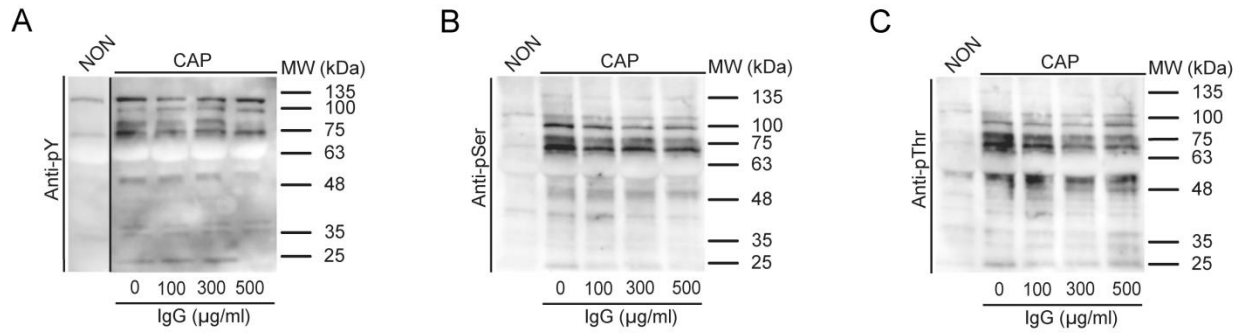
²*Section of Biología Celular y Molecular de la Reproducción, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina*

³*Section of Cellular and Developmental Biology, Department of Biological Sciences, Universidade Federal de São Paulo–Campus Diadema, Diadema, Brazil*

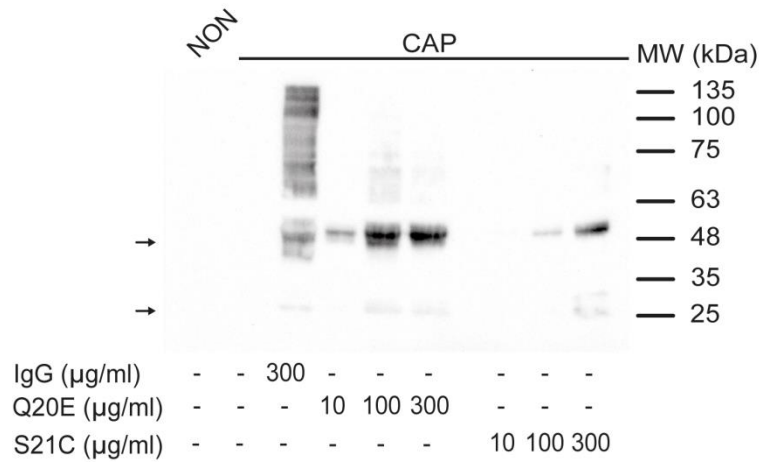
**Correspondence: Erick J.R. Silva, ejr.silva@unesp.br*

EPPIN			
Human	mgssgllsllvlfvllanvqg	<u>PGLTDWLFPRRCPKIREECE</u> FQERDVCTKDRQCQDNKKCCVFSCGKKCLDLKQ	74
Mouse	mklsgfvsilvlfglarvqg	<u>PSLADLLFPRRCPRFREE</u> HQERDLCTRDRDCPKKEKCCVFNCGKKCLNPQQ	74
		<u>qqPSLADLLFPRRCPRFREE</u> (Q20E)	
		<u>FPRRCPRFREECEHC</u> (F15C)	
Human		DVCEMPKETGPCLAYFLHWYDKDNTCSM <u>FVYGGCQGNNNNFQSKANCLNTCKNKRFP-</u>	133
Mouse		DICSLPKDSGYCMAYFRRWWFNKENSTCOV <u>FIYGGCQGNNNNFQSQSICQNA</u> CEKKSSLT	134
		<u>SMFVYGGCQGNNNNFQSKANC</u> (S21C)	

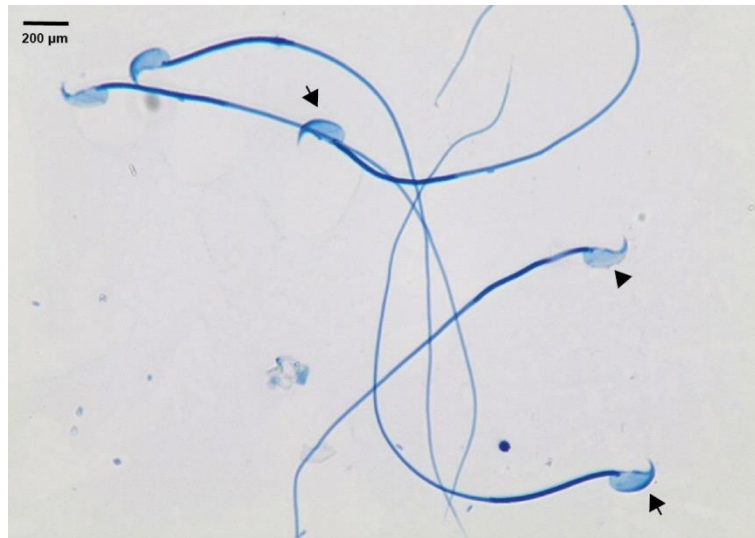
Supplementary Figure S1. Alignment of primary human (NP_065131) and 655 murine (NP_083601) EPPIN sequences. The signal peptide is shown in lowercase letters. The WFDC and Kunitz domains are underlined with continuous and dotted lines, respectively. Sequences recognized by the anti-EPPIN Q20E and F15C antibodies, produced against residues 20-39 and 29-43, respectively of murine EPPIN, and S21C, produced respectively against residues 103-121 of human EPPIN. The identical and conserved residues between human and murine EPPIN are highlighted in yellow and gray, respectively. The sequences Q20E and F15C are 65% and 73% identical between human and murine EPPIN, respectively, while the sequence S21C is 70% identical between human and murine EPPIN.



Supplementary Figure S2. Effects of normal rabbit IgG on capacitation-induced 663 tyrosine and serine/threonine phosphorylation in sperm proteins. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the absence or presence of increasing concentrations (100, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$) of normal rabbit IgG. Membranes were probed with anti-pY (A), anti-pSer (B), and anti-pThr (C) antibodies. MW indicates a standard protein ladder (kDa). These results are representative of 2-3 independent experiments.



Supplementary Figure S3. Identification of nonspecific bands recognized by the anti-rabbit secondary antibody used in western blot assays. Nonspecific bands are indicated by arrows and correspond to anti-EPPIN antibodies (IgG) heavy and light chains. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH medium. Sperm samples (5×10^6 cells/ml) were immediately processed (non-capacitating condition, NON) or incubated under capacitating conditions for 120 min in media supplemented NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP) in the absence or presence of increasing concentrations (10, 100 and $300 \mu\text{g/ml}$) of Q20E or S21C antibodies. Membranes were probed in the absence of primary antibody. MW indicates a standard protein ladder (kDa).



Supplementary Figure S4. Coomassie Brilliant Blue staining in acrosome reaction assays. Spermatozoa were collected from cauda epididymidis in non-capacitating TYH médium. Sperm samples (1.2×10^6 cells/ml) were incubated under capacitating conditions for 60 min in supplemented medium with NaHCO_3 and BSA at 37°C 5% CO_2 /95% air (capacitating condition, CAP). Coomassie Brilliant Blue staining of no-reacted (denoted by arrow) and reacted acrosome of mouse spermatozoa (arrowhead).

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram o efeito diferencial dos ligantes endógenos (SVS2) e exógenos (anticorpos anti-EPPIN) da EPPIN na fosforilação de proteínas espermáticas induzida pela capacitação e na atividade da PKA (avaliada de maneira indireta). Além disso, observamos o potencial envolvimento da EPPIN na reação acrossômica e na capacidade de fertilização dos espermatozoides murinos. Nossos achados sustentam a hipótese de que EPPIN modula aspectos funcionais do espermatozoide via interações proteína-proteína enquanto protege os espermatozoides durante sua jornada em direção à fertilização.

De fato, nossos resultados expandem o conhecimento sobre o envolvimento da EPPIN em eventos iniciais (fosforilação de proteínas e atividade da PKA) e tardios da capacitação (reação acrossômica e FIV). Dessa forma, fornecemos novas evidências de que a EPPIN pode estar envolvida em outros eventos espermáticos além do controle da motilidade. Em conjunto, essas observações contribuem para expandir os mecanismos potenciais pelos quais a EPPIN pode ser explorada como um alvo de fármaco contraceptivo masculino não hormonal.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-haila, A.; Tulsiani, D. R. P. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. **Arch Biochem Biophys**, v. 485, n. 1, p. 72-81, 2009. doi. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.003>.

Alvau, A.; Battistone, M. A.; Gervasi, M. G.; Navarrete, F. A. et al. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. **Development**, v. 143, n. 13, p. 2325-33, 2016. doi. 10.1242/dev.136499.

Anamthathmakula, P.; Winuthayanon, W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception. **Biol Reprod**, v. 103, n. 2, p. 411-26, 2020. doi. 10.1093/biolre/ioaa075.

Araki, N.; Kawano, N.; Kang, W.; Miyado, K. et al. Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. **Reproduction**, v. 152, n. 4, p. 313-21, 2016. doi. 10.1530/rep-15-0551.

Araki, N.; Trencsényi, G.; Krasznai, Z. T.; Nizsalóczki, E. et al. Seminal Vesicle Secretion 2 Acts as a Protectant of Sperm Sterols and Prevents Ectopic Sperm Capacitation in Mice. **Biol Reprod**, v. 92, n. 1, p. 8, 1-10-8, 1-10, 2015. doi. 10.1095/biolreprod.114.120642.

Balestrini, P. A.; Jabłoński, M.; Schiavi-Ehrenhaus, L. J.; Marín-Briggiler, C. I. et al. Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. **Mol Reprod Dev**, v. 87, n. 12, p. 1188-98, 2020. doi. 10.1002/mrd.23431.

Baro Graf, C.; Ritagliati, C.; Stival, C.; Luque, G. M. et al. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 518, p. 110992, 2020. doi. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110992>.

Belmonte, S. A.; Mayorga, L. S.; Tames, C. N. The Molecules of Sperm Exocytosis. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 220, p. 71-92, 2016. doi. 10.1007/978-3-319-30567-7_4.

Branham, M. T.; Bustos, M. A.; De Blas, G. A.; Rehmann, H. et al. Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. **J Biol Chem**, v. 284, n. 37, p. 24825-39, 2009. doi. 10.1074/jbc.M109.015362.

Buffone, M. G.; Foster, J. A.; Gerton, G. L. The role of the acrosomal matrix in fertilization. **Int J Dev Biol**, v. 52, n. 5-6, p. 511-22, 2008. doi. 10.1387/ijdb.072532mb.

Buffone, M. G.; Ijiri, T. W.; Cao, W.; Merdiushev, T. et al. Heads or tails? Structural events and

molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. **Mol Reprod Dev**, v. 79, n. 1, p. 4-18, 2012. doi. 10.1002/mrd.21393.

Chang, H.; Suarez, S. S. Two Distinct Ca²⁺ Signaling Pathways Modulate Sperm Flagellar Beating Patterns in Mice. **Biol Reprod**, v. 85, n. 2, p. 296-305, 2011. doi. 10.1095/biolreprod.110.089789.

Chen, H.; Mruk, D.; Xiao, X.; Cheng, C. Human Spermatogenesis and Its Regulation. In: (Ed.), 2017. p.49-72.

Clauss, A.; Lilja, H.; Lundwall, A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, n. 2, p. 383-89, 2005. doi.

Coy, P.; García-Vázquez, F. A.; Visconti, P. E.; Avilés, M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. **Reproduction**, v. 144, n. 6, p. 649-60, 2012. doi. 10.1530/rep-12-0279.

Da Silva, N.; Cortez-Retamozo, V.; Reinecker, H.-C.; Wildgruber, M. et al. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. **Reproduction**, v. 141, n. 5, p. 653-63, 2011. doi. 10.1530/rep-10-0493.

Darszon, A.; Nishigaki, T.; Beltran, C.; Treviño, C. L. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1305-55, 2011. doi. 10.1152/physrev.00028.2010.

de Lamirande, E.; Lamothe, G. Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. **Human Reprod**, v. 25, n. 7, p. 1619-30, 2010. doi. 10.1093/humrep/deq110.

de Lamirande, E.; Yoshida, K.; Yoshiike, T. M.; Iwamoto, T. et al. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. **J Androl**, v. 22, n. 4, p. 672-79, 2001. doi.

Ding, X.; Zhang, J.; Fei, J.; Bian, Z. et al. Variants of the EPPIN gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. **Human Reprod**, v. 25, n. 7, p. 1657-65, 2010. doi. 10.1093/humrep/deq119.

Eddy, E. M. The Spermatozoon. In: Jimmy, D. N.; Ph.D; Tony, M. P.; Donald, W. P.; John, R. G. C.; D.Sc; F.R.S.C; David, M. d. K.; M.D; A.O; JoAnne, S. R.; Paul M. Wassarman, P. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.3-54.

Ehrenwald, E.; Foote, R. H.; Parks, J. E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, v. 25, n. 2, p. 195-204, 1990. doi. 10.1002/mrd.1080250213.

Florman, H. M.; Ducibella, T. Fertilization in Mammals. In: Jimmy, D. N.;Ph.D;Tony, M. P.;Donald, W. P.;John, R. G. C.;D.Sc;F.R.S.C;David, M. d. K.;M.D;A.O;JoAnne, S. R.; Paul M. Wassarman, P. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.55-112.

Freitas, M. J.; Vijayaraghavan, S.; Fardilha, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. **Biol Reprod**, v. 96, n. 1, p. 2-12, 2017. doi. 10.1095/biolreprod.116.144337.

Galantino-Homer, H. L.; Visconti, P. E.; Kopf, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. **Biol Reprod**, v. 56, n. 3, p. 707-19, 1997. doi. 10.1095/biolreprod56.3.707.

Galdiero, F.; Tufano, M. A.; De Martino, L.; Capasso, C. et al. Inhibition of macrophage phagocytic activity by SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. **J Reprod Immunol**, v. 16, n. 3, p. 269-84, 1989. doi. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0378\(89\)90056-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0378(89)90056-9).

Gervasi, M. G.; Visconti, P. E. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. **Mol Reprod Dev**, v. 83, n. 10, p. 860-74, 2016. doi. 10.1002/mrd.22663.

Gervasi, M. G.; Visconti, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204-18, 2017. doi. 10.1111/andr.12320.

Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Li, H.; Wei, W. et al. The calpain system. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003. doi. 10.1152/physrev.00029.2002.

Hinton, B.; Avellar, M. Wolffian Duct Development. In: (Ed.), 2018.

Ho, H. C.; Suarez, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 519-26, 2001. doi. 10.1530/rep.0.1220519.

Hunter, R. H. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. **J Reprod Fertil**, v. 63, n. 1, p. 109-17, 1981. doi. 10.1530/jrf.0.0630109.

Hunter, R. H.; Nichol, R. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. **J Exp Zool**, v. 228, n. 1, p. 121-8, 1983. doi.

10.1002/jez.1402280113.

Inoue, N.; Ikawa, M.; Isotani, A.; Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 234-8, 2005. doi. 10.1038/nature03362.

Jahn, R.; Fasshauer, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 201-7, 2012. doi. 10.1038/nature11320.

Kawano, N.; Araki, N.; Yoshida, K.; Hibino, T. et al. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 11, p. 4145-50, 2014. doi. 10.1073/pnas.1320715111.

Kawano, N.; Yoshida, K.; Iwamoto, T.; Yoshida, M. Ganglioside GM1 Mediates Decapacitation Effects of SVS2 on Murine Spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 79, n. 6, p. 1153-59, 2008. doi. 10.1095/biolreprod.108.069054.

Kawano, N.; Yoshida, M. Semen-Coagulating Protein, SVS2, in Mouse Seminal Plasma Controls Sperm Fertility. **Biol Reprod**, v. 76, n. 3, p. 353-61, 2007. doi. 10.1095/biolreprod.106.056887.

Kim, K. S.; Gerton, G. L. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. **Dev Biol**, v. 264, n. 1, p. 141-52, 2003. doi. 10.1016/j.ydbio.2003.08.006.

Leclerc, P.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. **Biol Reprod**, v. 55, n. 3, p. 684-92, 1996. doi. 10.1095/biolreprod55.3.684.

Lin, S.; Ke, M.; Zhang, Y.; Yan, Z. et al. Structure of a mammalian sperm cation channel complex. **Nature**, v. 595, n. 7869, p. 746-50, 2021. doi. 10.1038/s41586-021-03742-6.

Lishko, P. V.; Botchkina, I. L.; Fedorenko, A.; Kirichok, Y. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 327-37, 2010. doi. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.053>.

Lishko, P. V.; Botchkina, I. L.; Kirichok, Y. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 387-91, 2011. doi. 10.1038/nature09767.

Lucchesi, O.; Ruete, M. C.; Bustos, M. A.; Quevedo, M. F. et al. The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLC ϵ /IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. **Biochim**

Biophys Acta, v. 1863, n. 4, p. 544-61, 2016. doi. 10.1016/j.bbamcr.2015.12.007.

Mangels, R.; Young, B.; Keeble, S.; Ardekani, R. et al. Genetic and phenotypic influences on copulatory plug survival in mice. **Heredity**, v. 115, n. 6, p. 496-502, 2015. doi. 10.1038/hdy.2015.50.

Mariani, N. A. P.; Camara, A. C.; Silva, A. A. S.; Raimundo, T. R. F. et al. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. **Mol Cell Endocrinol**, v. 506, p. 110754, 2020. doi. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110754>.

McCrudden, M. T.; Dafforn, T. R.; Houston, D. F.; Turkington, P. T. et al. Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. **FEBS J**, v. 275, n. 8, p. 1742-50, 2008. doi. 10.1111/j.1742-4658.2008.06333.x.

Metafora, S.; Peluso, G.; Persico, P.; Ravagnan, G. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. **Biochem Pharmacol**, v. 38, n. 1, p. 121-31, 1989a. doi. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90158-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(89)90158-5).

Metafora, S.; Porta, R.; Ravagnan, G.; Peluso, G. et al. Inhibitory effect of SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium, on phagocytosis and chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. **J Leukocyte Biol**, v. 46, n. 5, p. 409-16, 1989b. doi.

Miller, M. R.; Mannowetz, N.; Iavarone, A. T.; Safavi, R. et al. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 555-9, 2016. doi. 10.1126/science.aad6887.

Mitra, A.; Richardson, R. T.; O'Rand, M. G. Analysis of Recombinant Human Semenogelin as an Inhibitor of Human Sperm Motility. **Biol Reprod**, v. 82, n. 3, p. 489-96, 2010. doi. 10.1095/biolreprod.109.081331.

Navarro, B.; Kirichok, Y.; Clapham, D. E. KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 18, p. 7688-92, 2007. doi. 10.1073/pnas.0702018104.

Neuberger, G.; Schneider, G.; Eisenhaber, F. pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. **Biology direct**, v. 2, p. 1-1, 2007. doi. 10.1186/1745-6150-2-1.

Nolan, M. A.; Babcock, D. F.; Wennemuth, G.; Brown, W. et al. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 37, p. 13483-8, 2004. doi. 10.1073/pnas.0405580101.

O'Donnel, Liza; Robertson, Kirsten; Jones, Margaret; Simpson, Evan. Estrogen and Spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 289-318, 5 jun. 2001.

O'Rand, M. G.; Silva, E. J. R.; Hamil, K. G. Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. **Pharmacol Ther**, v. 157, p. 105-11, 2016. doi. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.004>.

O'Rand, M. G.; Widgren, E. E. Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. **Biol Reprod**, v. 86, n. 2, p. 55, 1-7, 2012. doi. 10.1095/biolreprod.111.094227.

O'Rand, M. G.; Widgren, E. E.; Beyler, S.; Richardson, R. T. Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-Eppin antibodies from infertile male monkeys: Effect on cyclic adenosine monophosphate. **Biol Reprod**, v. 80, n. 2, p. 279-85, 2009. doi. 10.1095/biolreprod.108.072942.

O'Rand, M. G.; Widgren, E. E.; Hamil, K. G.; Silva, E. J. et al. Epididymal Protein Targets: A Brief History of the Development of Epididymal Protease Inhibitor as a Contraceptive. **J Androl**, v. 32, n. 6, p. 698-704, 2011. doi. 10.2164/jandrol.110.012781.

O'Rand, M. G.; Widgren, E. E.; Sivashanmugam, P.; Richardson, R. T. et al. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with Eppin. **Science**, v. 306, n. 5699, p. 1189-90, 2004. doi. 10.1126/science.1099743.

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

Osheroff, J. E.; Visconti, P. E.; Valenzuela, J. P.; Travis, A. J. et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 11, p. 1017-26, 1999. doi. 10.1093/molehr/5.11.1017.

Pacey, A. A.; Davies, N.; Warren, M. A.; Barratt, C. L. et al. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. **Hum Reprod**, v. 10, n. 10, p. 2603-9, 1995. doi. 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135754.

Porta, R.; Metafora, S.; Esposito, C.; Mariniello, L. et al. Biological activities of a major protein secreted from the rat seminal vesicles after structural modification catalyzed by transglutaminase in vitro. **Immunopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 179-88, 1993. doi.

Puga Molina, L. C.; Luque, G. M.; Balestrini, P. A.; Marín-Briggiler, C. I. et al. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. **Front Cell Dev Biol**, v. 6, n. 72, 2018. doi. 10.3389/fcell.2018.00072.

Qi, H.; Moran, M. M.; Navarro, B.; Chong, J. A. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 4, p. 1219-23, 2007. doi. 10.1073/pnas.0610286104.

Quill, T. A.; Sugden, S. A.; Rossi, K. L.; Doolittle, L. K. et al. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 25, p. 14869-74, 2003. doi. 10.1073/pnas.2136654100.

Richardson, R. T.; Sivashanmugam, P.; Hall, S. H.; Hamil, K. G. et al. Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene**, v. 270, n. 1-2, p. 93-102, 2001. doi. S0378111901004620.

Rizo, J.; Südhof, T. C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 28, p. 279-308, 2012. doi. 10.1146/annurev-cellbio-101011-155818.

Robaire, B.; Hinton, B. T. The Epididymis. In: Plant, T. M.; Zeleznik, A. J. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2015. p.691-771.

Robert, M.; Gagnon, C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: association with semen coagulum. **Human Reprod**, v. 10, n. 8, p. 2192-97, 1995. doi.

Robert, M.; Gagnon, C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 6, p. 944-60, 1999. doi.

Sakaguchi, D.; Miyado, K.; Iwamoto, T.; Okada, H. et al. Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 11, 2020. doi. 10.3390/ijms21113961.

Salicioni, A. M.; Platt, M. D.; Wertheimer, E. V.; Arcelay, E. et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 65, p. 245-59, 2007. doi.

Shan, C.; Li, H.; Zhang, Y.; Li, Y. et al. Binding interactions of epididymal protease inhibitor and semenogelin-1: a homology modeling, docking and molecular dynamics simulation study. **PeerJ**, v. 7, p. e7329, 2019. doi. 10.7717/peerj.7329.

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

Silva, E. J. R.; Hamil, K. G.; Richardson, R. T.; O'Rand, M. G. Characterization of EPPIN's Semenogelin I binding site: A contraceptive drug target. **Biol Reprod**, v. 87, n. 3, p. 56, 1-8, 2012a. doi. 10.1095/biolreprod.112.101832.

Silva, E. J. R.; Patrão, M. T. C. C.; Tsuruta, J. K.; O'Rand, M. G. et al. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. **Mol Reprod Dev**, v. 79, n. 12, p. 832-42, 2012b. doi. 10.1002/mrd.22119.

Sivashanmugam, P.; Hall, S. H.; Hamil, K. G.; French, F. S. et al. Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. **Gene**, v. 312, p. 125-34, 2003. doi. S0378111903006085 [pii].

Sosa, C. M.; Pavarotti, M. A.; Zanetti, M. N.; Zoppino, F. C. et al. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. **Mol Hum Reprod**, v. 21, n. 3, p. 244-54, 2015. doi. 10.1093/molehr/gau110.

Sosa, C. M.; Zanetti, M. N.; Pocognoni, C. A.; Mayorga, L. S. Acrosomal Swelling Is Triggered by cAMP Downstream of the Opening of Store-Operated Calcium Channels During Acrosomal Exocytosis in Human Sperm. **Biol Reprod**, v. 94, n. 3, p. 57, 2016. doi. 10.1095/biolreprod.115.133231.

Sosnik, J.; Miranda, P. V.; Spiridonov, N. A.; Yoon, S. Y. et al. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 15, p. 2741-9, 2009. doi. 10.1242/jcs.047225.

Stival, C.; Puga Molina Ldel, C.; Paudel, B.; Buffone, M. G. et al. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 220, p. 93-106, 2016. doi. 10.1007/978-3-319-30567-7_5.

Suarez, S. S. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. **Biol Reprod**, v. 36, n. 1, p. 203-10, 1987. doi. 10.1095/biolreprod36.1.203.

Suarez, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reprod Update**, v. 14, n. 6, p. 647-57, 2008. doi. 10.1093/humupd/dmn029.

Suarez, S. S.; Pacey, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006. doi. 10.1093/humupd/dmi047.

Suarez, S. S.; Varosi, S. M.; Dai, X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 10, p. 4660-4, 1993. doi. 10.1073/pnas.90.10.4660.

Sun, X. H.; Zhu, Y. Y.; Wang, L.; Liu, H. L. et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 15, n. 1, p. 65, 2017. doi. 10.1186/s12958-017-0281-2.

Takano, H.; Yanagimachi, R.; Urch, U. A. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. **Zygote**, v. 1, n. 1, p. 79-91, 1993. doi. 10.1017/s0967199400001325.

Tulsiani, D. **Introduction to Mammalian Reproduction**. 2003.

Turner, T. T. Resorption versus secretion in the rat epididymis. **J Reprod Fertil**, v. 72, n. 2, p. 509-14, 1984. doi. 10.1530/jrf.0.0720509.

Urner, F.; Sakkas, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, n. 1, p. 17-26, 2003. doi. 10.1530/rep.0.1250017.

Visconti, P. E.; Bailey, J. L.; Moore, G. D.; Pan, D. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, n. 4, p. 1129-37, 1995a. doi.

Visconti, P. E.; Moore, G. D.; Bailey, J. L.; Leclerc, P. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**, v. 121, n. 4, p. 1139-50, 1995b. doi.

Vyklicka, L.; Lishko, P. V. Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. **Curr Opin Cell Biol**, v. 63, p. 154-61, 2020. doi. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.015>.

Wang, Z.; Widgren, E. E.; Richardson, R. T.; Orand, M. G. Eppin: a molecular strategy for male contraception. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 65, p. 535-42, 2007. doi.

Wang, Z.; Widgren, E. E.; Sivashanmugam, P.; O'Rand, M. G. et al. Association of Eppin with Semenogelin on Human Spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 72, n. 5, p. 1064-70, 2005. doi. 10.1095/biolreprod.104.036483.

Wolkowicz, M. J.; Shetty, J.; Westbrook, A.; Klotz, K. et al. Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis. **Biol Reprod**, v. 69, n. 3, p. 735-45, 2003. doi. 10.1095/biolreprod.103.016675.

Xue, Y.; Ren, J.; Gao, X.; Jin, C. et al. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1598-608, 2008. doi. 10.1074/mcp.M700574-MCP200.

Yenugu, S.; Richardson, R. T.; Sivashanmugam, P.; Wang, Z. et al. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. **Biol Reprod**, v. 71, n. 5, p. 1484-90, 2004. doi. 10.1095/biolreprod.104.031567.

Yoshida, M.; Kawano, N.; Yoshida, K. Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 21, p. 3446-57, 2008. doi. 10.1007/s00018-008-8230-z.

Zanetti, N.; Mayorga, L. S. Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. **Biol Reprod**, v. 81, n. 2, p. 396-405, 2009. doi. 10.1095/biolreprod.109.076166.

Zhang, J.; Ding, X.; Bian, Z.; Xia, Y. et al. The effect of anti-eppin antibodies on ionophore A23187-induced calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 25, n. 1, p. 29-36, 2010. doi. 10.1093/humrep/dep356.

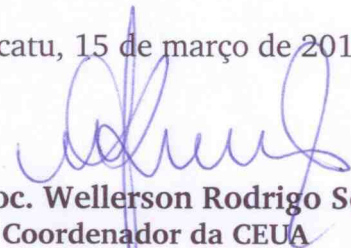
Zhou, W.; De Iuliis, G. N.; Dun, M. D.; Nixon, B. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. **Frontiers Endocrinol**, v. 9, n. 59, 2018. doi. 10.3389/fendo.2018.00059.

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação do papel da EPPIN no controle da função espermática: impacto na capacitação e no potencial fértil de espermatozoides de camundongos", Protocolo nº 1138-CEUA, sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 20/03/2019	Término: 20/04/2021
Espécie/linhagem:	Camundongo Suiço (macho) e C57BL6 (fêmea)	
Nº de animais:	62	
Peso:	15 a 50 gramas	Idade: 70 a 120 dias
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Anilab Animais de Laboratórios Criação e Comércio Ltda EPP – CNPJ: 65.440.612/0001-40	

Botucatu, 15 de março de 2019.

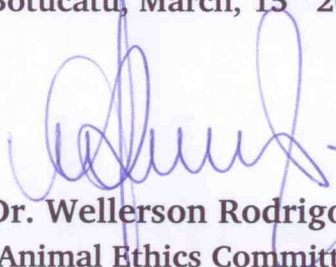

Prof. Assoc. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da CEUA



Certificate

We certify that the protocol nº 1138 about "On the role of EPPIN in the control of sperm function: effects on capacitation and fertilizing potential of mouse spermatozoa" agree with Brazilian legislation regulated by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH formulated by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals, and was approved by the BIOSCIENCE INSTITUTE/UNESP ETHICS COMMITTEE ON USE OF ANIMALS (CEUA), in March 15th, 2019.

Botucatu, March, 15th 2019.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Animal Ethics Committees
Institute of Biosciences of Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação do papel da EPPIN na fertilidade de espermatozoides de camundongos", Protocolo nº **1183-CEUA**, sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *Ad referendum* da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/10/2019	Término: 1/10/2021
Espécie/linhagem:	Camundongo BALB/cByJ (macho) e C57BL/6 (fêmea)	
Nº de animais:	42	
Peso:	15 a 50 gramas	Idade: 70 a 120 dias
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	CEMIB- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório. CNPJ: 46.068.425/0001-33	

Botucatu, 2 de setembro de 2019.

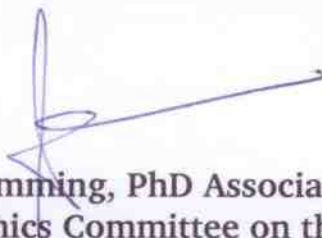
Prof. Assoc. Bruno Cesar Schimming
Vice-Coordenador da CEUA



Certificate

We certify that the protocol nº **1183** about "On the role of mouse EPPIN on the fertility of spermatozoa" agree with Brazilian legislation regulated by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH formulated by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals, and was approved by the BIOSCIENCE INSTITUTE/UNESP ETHICS COMMITTEE ON USE OF ANIMALS (CEUA), in September 2nd, 2019.

Botucatu, September 2nd, 2019.



Bruno Cesar Schimming, PhD Associate Professor
Vice-Coordinator of Ethics Committee on the Use of Animals
São Paulo State University (UNESP)



São Paulo, 13 de novembro de 2019
CEUA N [2521131119](#)

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: [036.984.634-66](#)

Título do projeto: [Investigação do papel da EPPIN no controle da função espermiática: impacto no potencial fértil de espermatozoides de camundongos.](#)

Responsável: [Marcelo Tigre Moura](#)

Equipe: [Fabíola Freitas de Paula Lopes, Erick J. R. Silva, Tamiris Rocha Fanti Raimundo](#)

Telefone: [81 992166011](#) e-mail: marcelotmoura@gmail.com

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://ceua.sirpp.unifesp.br>) por meio da sua senha de acesso.



Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo