RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 31/07/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu – Campus de Botucatu

Beatriz Rezende Santos

PROTEÍNAS DE INTERAÇÃO DA EPPIN NO ESPERMATOZOIDE HUMANO: POTENCIAIS PAPÉIS NA FERTILIDADE E NA CONTRACEPÇÃO MASCULINA

Botucatu, São Paulo

2026

BEATRIZ REZENDE SANTOS

PROTEÍNAS DE INTERAÇÃO DA EPPIN NO ESPERMATOZOIDE HUMANO: POTENCIAIS PAPÉIS NA FERTILIDADE E NA CONTRACEPÇÃO MASCULINA

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Candidata: Beatriz Rezende Santos

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Coorientadora: Dra. Noemia Aparecida Partelli Mariani

Botucatu, São Paulo

2026

S237p

Santos, Beatriz Rezende
PROTEÍNAS DE INTERAÇÃO DA EPPIN NO ESPERMATOZOIDE HUMANO : POTENCIAIS PAPÉIS NA FERTILIDADE E NA CONTRACEPÇÃO MASCULINA / Beatriz Rezende Santos. -- , 2026
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,
Orientador: Erick José Ramo da Silva
Coorientadora: Noemia Aparecida Partelli Mariani

1. Contracepção masculina. 2. Espermatozoide humano. 3. Fertilidade masculina. 4. Interação proteína-proteína. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide humano: potenciais papéis na fertilidade e na contracepção masculina

AUTORA: BEATRIZ REZENDE SANTOS
ORIENTADOR: ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA
COORIENTADORA: NOEMIA APARECIDA PARTELLI MARIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Farmacologia e Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA (Participaçao Presencial)
Departamento de Biofísica e Farmacologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. ANA CAROLINA INHASZ KISS (Participaçao Presencial)
Departamento de Fisiologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Prof. Dr. MARCELO TIGRE MOURA (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Celular e Molecular / Universidade Federal da Paraíba

Botucatu, 31 de julho de 2026.

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me direcionou em cada passo e me capacitou para chegar até aqui. Agradeço a Ele por me conceder força e coragem para enfrentar os desafios e por colocar pessoas especiais em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Adevaldo Brito Santos e Elba D. O. Rezende Santos, por me apoiarem em todo o processo do mestrado, sempre me dando conselhos valiosos e me ajudando a enfrentar os desafios da pós-graduação. Agradeço por estarem presentes apesar da distância. Agradeço também a minha avó, Maria Hilda Rezende, e ao meu avô, José Rezende (*in memorian*), por me incentivarem e motivarem a seguir meus sonhos.

Agradeço ao meu noivo, Samuel Vitalino, por seu amor e apoio nos momentos felizes e nos momentos desafiadores. Agradeço por ser meu porto seguro em dias difíceis e sempre me incentivar a perseguir meus objetivos. Agradeço a minha sogra, Valéria Fonseca, e ao David Fonseca, por me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos e irmãos do coração, Ana Barros, Gabriella Cristina, Gessica Santiago, Rodrigo Vitalino, Geisa Santiago, Erik Miranda, Tainá Miotto e Landa Munhoz, por estarem presentes, por se preocuparem e sempre serem meu apoio nos momentos de dificuldade. Agradeço por me ouvirem e me motivarem a atingir meus sonhos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Natália Santos, Noemia Mariani, Juliana Bizzotto, Poliana Martini, Célio Fernandes, Alexandre Dorth, Mariana Gomes, Isabela Andrade, Lucas Kenji e Rafael Marques, por me ensinarem a ser uma cientista excelente, pelas risadas e por todos os momentos juntos.

Agradeço ao meu orientador, Erick Silva, por me guiar no caminho, me ensinando a ser uma cientista curiosa e crítica e uma profissional melhor todos os dias. Agradeço por me proporcionar as condições para que eu pudesse alcançar os meus objetivos científicos e profissionais e por sempre acreditar no meu potencial.

Agradeço à Professora Lucilene Delazari pela parceria, pelo apoio científico, pelos conselhos, pelas discussões enriquecedoras e pela paciência e zelo para passar os seus conhecimentos a mim.

Agradeço à Gisela Daroz e à Dra. Ana Gabriela pela parceria e pelo apoio para que este projeto fosse possível.

Agradeço aos colegas e servidores do departamento de Biofísica e Farmacologia, Ana Cristina Murcia, Hélio Kushima, Flávia Bessi, Paulo Mioni, Silvia e Giovana, por me fornecerem todo o apoio necessário, pelas conversas e por todos os momentos.

Por fim, agradeço à banca examinadora por se dispor a avaliar este trabalho e contribuir para a conclusão do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 88887.941600/2024-00.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, concedido por meio dos Processos nº 200672/2025-8.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2021/06718-7.

RESUMO

A proteína espermática EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) é um alvo para contracepção masculina, devido ao seu papel na modulação da motilidade espermática. Composta por dois domínios inibidores de protease, um do tipo Kunitz (C-terminal) e outro do tipo WFDC (N-terminal), a EPPIN atua como um centro de interações proteicas no espermatozoide, destacando-se a sua ligação com a SEMG1 (semenogelina-1), proteína mais abundante do plasma seminal. O complexo EPPIN/SEMG1 promove a inibição da motilidade espermática após a ejaculação. A aquisição da motilidade ocorre após a clivagem proteolítica da SEMG1 pela PSA (antígeno prostático específico), enzima secretada pela próstata, o que também resulta na liquefação do sêmen. Estudos do nosso grupo mostraram que anticorpos anti-EPPIN específicos aos domínios Kunitz e WFDC comprometem a motilidade espermática e as taxas de fertilização *in vitro* em camundongos. Além disso, moléculas sintéticas miméticas à SEMG1, como o composto EP055, inibem a motilidade espermática em modelos não humanos via interação com a EPPIN. Apesar desses avanços, os mecanismos pelos quais a EPPIN exerce suas funções e sua localização subcelular no espermatozoide humano carecem de elucidação. Portanto, este trabalho teve como **objetivo caracterizar o interactoma da EPPIN e sua localização celular no espermatozoide humano**. Por meio de ensaios de coimunoprecipitação seguidos de espectrometria de massas (LC-MS/MS), observamos que os domínios da EPPIN se associam tanto a proteínas intrínsecas do espermatozoide, essenciais à função espermática, como AKAP4 e GAPDHS, quanto a proteínas do plasma seminal já conhecidas por interagirem com a EPPIN, como CLU, LTF e SEMG1. Corroborando esses resultados, a EPPIN foi detectada em frações subcelulares associadas à membrana e a proteínas solúveis, bem como em frações associadas ao núcleo, organelas e estruturas acessórias do flagelo. Ensaios de imunofluorescência revelaram a distribuição diferencial da EPPIN e sua colocalização com proteínas parceiras como a SEMG1, principalmente na região equatorial da cabeça e nas peças de conexão, intermediária e principal do flagelo. Também observamos a sua colocalização com a AKAP4 no flagelo espermático, interação que foi confirmada por ensaios de ligação por proximidade. A associação da EPPIN tanto a proteínas intrínsecas do espermatozoide quanto a proteínas seminais revela o seu papel multifuncional. Este trabalho amplia o conhecimento sobre a biologia do espermatozoide, contribuindo tanto para o desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico da infertilidade masculina quanto para o desenho racional de ligantes da EPPIN aplicáveis à contracepção masculina não hormonal. **Palavras-chave:** contracepção masculina, espermatozoide humano, fertilidade, interação proteína-proteína.

ABSTRACT

The sperm associated protein EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) is a target for male contraception due to its ability to modulate sperm motility. Composed of two protease inhibitor domains, a Kunitz-type domain (C-terminal) and a WFDC-type domain (N-terminal), EPPIN acts as a central hub for protein interactions in the spermatozoa, highlighting its binding to SEMG1 (semenogelin-1), the most abundant protein in seminal plasma. The EPPIN/SEMG1 complex inhibits sperm motility after ejaculation. The acquisition of motility occurs after SEMG1 proteolytic cleavage by PSA (prostatic specific antigen), an enzyme secreted by the prostate, which also results in semen liquefaction. Studies from our group have shown that anti-EPPIN antibodies targeting epitopes on the Kunitz and WFDC domains inhibit sperm motility and in vitro fertilization rates in mice. Furthermore, synthetic SEMG1-mimetic molecules, such as EP055, inhibit sperm motility in non-human models by interacting with EPPIN. Despite these advances, the mechanisms underlying EPPIN's functions, as well as its subcellular localization in human spermatozoa, remain poorly understood. Thus, **this study aimed to characterize the EPPIN interactome and its subcellular localization in human spermatozoa**. Using co-immunoprecipitation assays followed by mass spectrometry (LC-MS/MS), we found that EPPIN domains associate with both intrinsic proteins of human spermatozoa essential for sperm function, such as AKAP4 and GAPDHS, and seminal plasma proteins already known to interact with EPPIN, such as CLU, LTF, and SEMG1. Consistent with these results, EPPIN was detected in membrane-associated and soluble protein fractions, as well as in fractions associated with the nucleus, organelles, and flagellar accessory structures. Immunofluorescence assays revealed the differential distribution of EPPIN and its colocalization with its binding partner SEMG1, mainly in the equatorial region of the head and in the connecting piece, midpiece, and principal piece of the flagellum. We also observed its colocalization with AKAP4 in the sperm flagellum, an interaction confirmed by proximity ligation assays. The association of EPPIN with both intrinsic sperm proteins and seminal proteins reveals its multifunctional role in human spermatozoa. This work expands current knowledge on sperm biology, contributing both to the development of new diagnostic strategies for male infertility and to the rational design of EPPIN ligands focused on non-hormonal male contraception.

Keywords: male contraception, human spermatozoa, fertility, protein-protein interaction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1. Introdução

Figura 1. Representação esquemática do trajeto espermático da espermatogênese à fertilização

Figura 2. Modelo dos aspectos estruturais da proteína EPPIN.

Capítulo 3. *Unravelling the EPPIN interactome in human spermatozoa*

Figure 1. Distribution profile of proteins from human ejaculated spermatozoa immunoprecipitated with EPPIN.

Figure 2. Venn diagram showing the similarities between EPPIN domain-associated proteins.

Figure 3. Functional enrichment of proteins immunoprecipitated with EPPIN based on the Gene Ontology (GO) database.

Figure 4. Distribution of EPPIN in human ejaculated spermatozoa.

Figure 5. Cellular distribution of EPPIN and its binding partner SEMG1 in human spermatozoa.

Figure 6. Cellular distribution of EPPIN and AKAP4 in human spermatozoa.

Supplementary Fig. S1. EPPIN expression in different human sperm fractions.

Supplementary Fig. S2. Negative controls of immunofluorescence assays.

Supplementary Fig. S3. Negative controls of protein ligation assays.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EPPIN: inibidor de protease epididimário

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

EPC: *EPPIN protein complex,* do inglês

SEMG1: semenogelina-1

PSA: antígeno prostático específico

CLU: clusterina

LTF: lactotransferrina, lactoferrina

AKAP4: proteína de ancoragem da quinase-A 4

GAPDHS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, espermatogênica

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução

1.1. Introdução..... 11

1.2. Aspectos estruturais e funcionais da proteína EPPIN..... 14

1.3. A EPPIN como alvo espermático para a contracepção masculina..... 16

1.4. Perspectivas na caracterização da proteína EPPIN..... 17

CAPÍTULO 2 – Objetivos

2.1. Objetivos gerais..... 20

2.2. Objetivos específicos..... 20

CAPÍTULO 3 – *Unraveling the EPPIN interactome in human spermatozoa*

Unraveling the EPPIN interactome in human spermatozoa..... 22

Abstract..... 22

Introduction..... 24

Materials and methods..... 26

Results..... 30

Discussion..... 39

References..... 42

Supplementary data..... 47

CAPÍTULO 4 – Conclusão 51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

Anexos

1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/HC-Botucatu..... 58

2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP..... 59

3. Coautoria em artigo publicado como pré-print..... 61

4. Normas do Programa de Ciências Biomoleculares e Farmacológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências..... 62

5. Súmula curricular da candidata à titulação de mestre..... 64

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. INTRODUÇÃO

Cerca de 121 milhões de gestações não planejadas ocorrem todos os anos no mundo, o que contribui para o crescimento desenfreado da população, além de desfechos negativos para a saúde da mulher e de seus filhos, instabilidade financeira e vulnerabilidade social para as famílias (UNFPA, 2022). Para pessoas sexualmente ativas, o método mais eficaz para prevenir uma gravidez é o uso de estratégias contraceptivas, que incluem métodos farmacológicos e não farmacológicos.

Para o público feminino, opções contraceptivas hormonais vêm sendo utilizadas desde os anos 1960, e diversas opções hormonais e não-hormonais estão disponíveis atualmente (Christin-Maitre, 2013; Howard & Benhabbour, 2023). Ainda assim, de 15 a 30% dos casais que utilizam métodos contraceptivos optam por métodos masculinos para contracepção, os quais se resumem a dois: (i) o preservativo, popularizado desde o século XVIII, de uso imediato e reversível, mas que apresenta risco de falha de 13 a 16%, principalmente associado ao uso incorreto pelo usuário (Anderson & Baird, 2002; Sundaram *et al.*, 2017); e (ii) a vasectomia, utilizada desde o início do século XX, um método cirúrgico e eficaz, porém com baixo índice de reversibilidade (Nickels & Yan, 2023). Além disso, estudos apontam que cerca de 75% dos homens têm interesse em utilizar novos métodos de inibição da fertilidade (Nguyen & Jacobsohn, 2023). Esse dado revela o interesse do público masculino em ter autonomia contraceptiva e em dividir as tarefas relacionadas ao planejamento familiar com suas parceiras.

O compartilhamento das tarefas contraceptivas, bem como a promoção da saúde reprodutiva e do planejamento familiar serão diretamente impactados pela entrada de novos métodos contraceptivos masculinos no mercado. Os estudos em contracepção masculina hormonal focam principalmente nas preparações farmacológicas compostas por androgênios e progestinas, que inibem a espermatogênese ao bloquear a secreção de gonadotrofinas pela adeno-hipófise (Nieschlag, 2011; Thirumalai & Amory, 2021). No entanto, este método apresenta um longo tempo de latência - de 3 a 4 meses - para a indução de oligospermia ou azoospermia, já que a espermatogênese é um processo longo, que leva cerca de 72 dias em homens, o que também impacta o tempo de reversão do seu efeito após a suspensão do tratamento (Thirumalai & Amory, 2021). Além disso, estratégias hormonais têm efeitos adversos típicos de preparações contendo hormônios esteroides sexuais ou seus análogos, que dificultam a implementação desta classe de contraceptivos (Thirumalai & Amory, 2021). Para superar esse desafio, surgem então os contraceptivos masculinos não hormonais como alternativa reversível e eficaz, propondo a inibição

temporária da fertilidade sem alterar os níveis plasmáticos de hormônios sexuais (Thirumalai & Amory, 2021; Mariani *et al.*, 2023). As estratégias não hormonais visam evitar a fecundação, inibindo reversivelmente a produção e a fisiologia do espermatozoide ou impedindo sua chegada ao sêmen durante a ejaculação (O'Rand *et al.*, 2016).

Os espermatozoides saem dos testículos morfologicamente diferenciados, porém imóveis e inaptos para fertilização do oócito. Para aquisição dessas habilidades, os gametas devem passar por duas etapas de maturação pós-testicular (Fig. 1) (Gervasi *et al.*, 2016). A primeira, chamada de maturação epididimária, ocorre durante o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo, onde adquirem capacidade de se moverem progressivamente a partir da interação com componentes do fluido luminal epididimário, o que também os torna aptos para passar pela segunda etapa de maturação pós-testicular - a capacitação (Fig. 1) (Aitken *et al.*, 2007; Aitken & Nixon, 2013; Freitas *et al.*, 2017). Esta ocorre após a ejaculação no trato reprodutor feminino e envolve uma série de eventos bioquímicos e moleculares que preparam o espermatozoide para a fertilização (Fig. 1) (Aitken & Nixon, 2013; Gervasi *et al.*, 2016).

No contexto da fertilização natural, a capacitação espermática é mediada por diversos componentes seminais e do trato reprodutor feminino (Bedford, 1970; Hunter & Hall, 1974; Aitken, 2006). Durante a capacitação, os espermatozoides mudam seu padrão de motilidade de progressivo para hiperativado e adquirem potencial para sofrer a exocitose acrossomal e fertilizar o oócito (Fig. 1) (Freitas *et al.*, 2017; Gervasi & Visconti, 2017). Como os espermatozoides são essencialmente células silenciosas do ponto de vista da transcrição gênica e da tradução proteica, sua função é essencialmente regulada por eventos como modificações proteicas pós-traducionais, interações proteína-proteína e fluxo iônico através da membrana plasmática (De Jonge, 2005; Freitas *et al.*, 2017; Puga Molina *et al.*, 2018). Nesse sentido, os processos associados aos eventos pós-testiculares são cruciais para a fertilidade masculina, o que torna o espermatozoide maduro um alvo potencial para a contracepção masculina não hormonal.

References

Aitken, R. J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A. J., Lee, Y. H., Baker, M. A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. **Asian J Androl** 9(4): 554-564. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2007.00280.x.

Aldana, A., Carneiro, J., Martinez-Mekler, G., Darszon, A. (2021). Discrete Dynamic Model of the Mammalian Sperm Acrosome Reaction: The Influence of Acrosomal pH and Physiological Heterogeneity. **Front Physiol** 12: 682790. DOI: 10.3389/fphys.2021.682790.

Barrachina, F., Battistone, M. A., Castillo, J., Mallofre, C., Jodar, M., Breton, S., Oliva, R. (2022). Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. **Hum Reprod** 37(4): 651-668. DOI: 10.1093/humrep/deac015.

Bu, D., Luo, H., Huo, P*., et al.* (2021). KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. **Nucleic Acids Res** 49(W1): W317-W325. DOI: 10.1093/nar/gkab447.

Carvalho, P. C., Lima, D. B., Leprevost, F. V., Santos, M. D., Fischer, J. S., Aquino, P. F., Moresco, J. J., Yates, J. R., 3rd, Barbosa, V. C. (2016). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nat Protoc** 11(1): 102-117. DOI: 10.1038/nprot.2015.133.

De La Vega-Beltran, J. L., Sanchez-Cardenas, C., Krapf, D., Hernandez-Gonzalez, E. O., Wertheimer, E., Trevino, C. L., Visconti, P. E., Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. **J Biol Chem** 287(53): 44384-44393. DOI: 10.1074/jbc.M112.393488.

De Lamirande, E., Yoshida, K., Yoshiike, M., Iwamoto, T., Gagnon, C. (2001). Semenogelin, the Main Protein of Semen Coagulum, Inhibits Human Sperm Capacitation by Interfering With the Superoxide Anion Generated During This Process. **J Androl** 22(4): 672-679. DOI: 10.1002/J.1939-4640.2001.TB02228.X.

Ding, X., Zhang, J., Bian, Z.*, et al.* (2010). Variants in the Eppin gene show association with semen quality in Han-Chinese population. **Reprod Biomed Online** 20(1): 125-131. DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.10.025.

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

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

Gul, M., Russo, G. I., Kandil, H.*, et al.* (2024). Male Infertility: New Developments, Current Challenges, and Future Directions. **World J Mens Health** 42(3): 502-517. DOI: 10.5534/wjmh.230232.

Hernandez-Herrador, M., Marilina, G. A., Luisa Hortas, M., Carrillo-Lucena, S., Caracuel, Z., Castilla-Alcala, J. A., Martin-Garcia, D., Redondo, M. (2024). Clusterin expression and distribution in spermatozoa as predictor of male fertility. **Mol Reprod Dev** 91(7): e23764. DOI: 10.1002/mrd.23764.

Inhorn, M. C., Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. **Hum Reprod Update** 21(4): 411-426. DOI: 10.1093/humupd/dmv016.

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

Kent, K., Nozawa, K., Parkes, R.*, et al.* (2024). Large-scale CRISPR/Cas9 deletions within the WFDC gene cluster uncover gene functionality and critical roles in mammalian reproduction. **Proc Natl Acad Sci U S A** 121(51): e2413195121. DOI: 10.1073/pnas.2413195121.

Kuo, Y. W., Li, S. H., Maeda, K., Gadella, B. M., Tsai, P. S. (2016). Roles of the reproductive tract in modifications of the sperm membrane surface. **J Reprod Dev** 62(4): 337-343. DOI: 10.1262/jrd.2016-028.

Linck, R. W., Albertini, D. F., Kenney, D. M., Langevin, G. L. (1982). Tektin filaments: chemically unique filaments of sperm flagellar microtubules. **Prog Clin Biol Res** 80: 127-132. DOI: 10.1002/cm.970020724.

Liu, B., Wang, Z., Zhang, W. (2010). Eppin, a novel marker to differentially diagnose azoospermia? **Med Hypotheses** 75(6): 681. DOI: 10.1016/j.mehy.2010.08.009.

Liu, Y., Li, Y., Meng, L.*, et al.* (2023). Bi-allelic human TEKT3 mutations cause male infertility with oligoasthenoteratozoospermia owing to acrosomal hypoplasia and reduced progressive motility. **Hum Mol Genet** 32(10): 1730-1740. DOI: 10.1093/hmg/ddad013.

Maciel, V. L., Jr., Tamashiro, L. K., Bertolla, R. P. (2019). Post-translational modifications of seminal proteins and their importance in male fertility potential. **Expert Rev Proteomics** 16(11-12): 941-950. DOI: 10.1080/14789450.2019.1693895.

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

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

Nixon, B., De Iuliis, G. N., Hart, H. M.*, et al.* (2019). Proteomic Profiling of Mouse Epididymosomes Reveals their Contributions to Post-testicular Sperm Maturation. **Mol Cell Proteomics** 18(Suppl 1): S91-S108. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000946.

O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Beyler, S., Richardson, R. T. (2009). Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: Effect on cyclic adenosine monophosphate. **Biol Reprod** 80(2): 279-285. DOI: 10.1095/biolreprod.108.072942.

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

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

O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T., Zelinski, M. (2018). Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. **PLoS ONE** 13(4): 19;13(14):e0195953. DOI: 10.1371/journal.pone.0195953.

Paasch, U., Heidenreich, F., Pursche, T.*, et al.* (2011). Identification of increased amounts of eppin protein complex components in sperm cells of diabetic and obese individuals by difference gel electrophoresis. **Mol Cell Proteomics** 10(8): M110 007187. DOI: 10.1074/mcp.M110.007187.

Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G.*, et al.* (2024). MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. **Nucleic Acids Res** 52(W1): W398-W406. DOI: 10.1093/nar/gkae253.

Richardson, R. T., Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., Moore, P. A., Ruben, S. M., French, F. S., O'Rand, M. (2001). Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of

protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene** 270(1-2): 93-102. DOI: 10.1016/s0378-1119(01)00462-0.

Robert, M., Gibbs, B. F., Jacobson, E., Gagnon, C. (1997). Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I. **Biochemistry** 36(13): 3811-3819. DOI: 10.1021/bi9626158.

Roy, A., Lin, Y. N., Agno, J. E., DeMayo, F. J., Matzuk, M. M. (2009). Tektin 3 is required for progressive sperm motility in mice. **Mol Reprod Dev** 76(5): 453-459. DOI: 10.1002/mrd.20957.

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

Silva, E. J., Hamil, K. G., Richardson, R. T., O'Rand, M. G. (2012). Characterization of EPPIN's semenogelin I binding site: a contraceptive drug target. **Biol Reprod** 87(3): 56. DOI: 10.1095/biolreprod.112.101832.

Sullivan, R. (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. **Asian J Androl** 17(5): 726-729. DOI: 10.4103/1008-682X.155255.

Sylvestre, T. F., Cavalcante, R. S., da Silva, J. F., Paniago, A. M. M., Weber, S. S., Pauletti, B. A., de Carvalho, L. R., Dos Santos, L. D., Mendes, R. P. (2018). Ceruloplasmin, transferrin and apolipoprotein A-II play important role in treatment's follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **PLoS One** 13(10): e0206051. DOI: 10.1371/journal.pone.0206051.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C*., et al.* (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Res** 49(D1): D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.

Takiguchi, H., Murayama, E., Kaneko, T., Kurio, H., Toshimori, K., Iida, H. (2011). Characterization and subcellular localization of Tektin 3 in rat spermatozoa. **Mol Reprod Dev** 78(8): 611-620. DOI: 10.1002/mrd.21352.

Vadnais, M. L., Aghajanian, H. K., Lin, A., Gerton, G. L. (2013). Signaling in sperm: toward a molecular understanding of the acquisition of sperm motility in the mouse epididymis. **Biol Reprod** 89(5): 127. DOI: 10.1095/biolreprod.113.110163.

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

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

WHO (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. W. H. Organization.

Wu, J., Dong, X., Liu, K., Xia, Y., Wang, X., Shen, O., Ding, X., Zhang, J. (2019). Association of semenogelin (SEMG) gene variants in idiopathic male infertility in Chinese-Han population. **J Toxicol Environ Health A** 82(16): 928-934. DOI: 10.1080/15287394.2019.1669304.

Zalata, A., El-Samanoudy, A. Z., Shaalan, D., El-Baiomy, Y., Taymour, M., Mostafa, T. (2012). Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. **J Urol** 188(4): 1260-1264. DOI: 10.1016/j.juro.2012.06.012.

Zhang, G., Li, D., Tu, C.*, et al.* (2021). Loss-of-function missense variant of AKAP4 induced male infertility through reduced interaction with QRICH2 during sperm flagella development. **Hum Mol Genet** 31(2): 219-231. DOI: 10.1093/hmg/ddab234.