RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/07/2022.



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

Juliana de Jesus Andrade

Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a

motilidade de espermatozoides de camundongos: repercussões para

a função espermática e fertilidade

Botucatu-SP 2020



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

Juliana de Jesus Andrade

Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a

motilidade de espermatozoides de camundongos: repercussões para

a função espermática e fertilidade

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

Candidata: Juliana de Jesus Andrade

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Botucatu-SP 2020 FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Juliana de Jesus. Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos : repercussões para a função espermática e fertilidade / Juliana de Jesus Andrade. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu Orientador: Erick José Ramo da Silva

Capes: 21000000

Espermatozoides. 2. Proteínas de plasma seminal.
 Motilidade espermática. 4. Camundongos como animais de laboratório.

Palavras-chave: Espermatozoide; Glândula seminal; Motilidade; SVS2; SVS3.

Auxílio Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo #2015/08227-0)

Aos meus pais, Amadeu e Elenice, por serem a minha maior fonte de inspiração e coragem. E meu esposo Gilmar por ser meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e coragem para vencer todas as dificuldades e obstáculos.

À minha mãe Elenice por todo apoio e carinho nas horas mais difíceis, e ao meu pai Amadeu (*in memorian*) que sempre acreditou que eu seria capaz.

Ao meu esposo Gilmar pelo grande apoio, força e por compreender minha ausência.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo.

Aos meus grandes amigos Noemia Partelli Mariani, Tamiris Rocha Fanti Raimundo, Alan Andrew dos Santos Silva, Alexandre Dorth Andrade, Hélio Kushima, Priscila Almeida, Leonardo Rokita, Gledson Miranda, Isabela Andrade e Janete por todo apoio, ensinamentos e por tornarem meus dias mais alegres e me mostrarem o verdadeiro sentido de amizade e trabalho em equipe.

Ao meu orientador Erick José Ramo da Silva por ser um excelente profissional, por todo ensinamento, pela paciência e principalmente por acreditar em mim e me dar todo apoio para a conclusão de um sonho.

A todos os professores e funcionários do departamento de Biofísica e Farmacologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, em especial ao professor Carlos Alan Candido Dias Junior, assim como suas alunas Ediléia Souza, Gabriela Zochio e Letícia Polônio pela contribuição para a minha formação e ótima convivência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo #2015/08227-0.

RESUMO

Proteínas do plasma seminal possuem o importante papel de regular a função espermática, sendo fundamentais para a fertilidade masculina. Em primatas e roedores, as proteínas mais abundantes do plasma seminal são as semenogelinas (SEMG1 e SEMG2) e as SVS's (SVS2 e SVS3; seminal vesicle-secretory proteins), respectivamente, as quais possuem similaridades funcionais e estruturais. Essas proteínas fazem parte de uma família conhecida como REST (Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed), sendo abundantemente expressas pela glândula seminal de mamíferos. A SEMG1 interage com o espermatozoide ejaculado e inibe a sua motilidade, capacitação e reação acrossômica. Por sua vez, a SVS2 também inibe a capacitação e a reação acrossômica no espermatozoide murino, sendo estes efeitos inibitórios potencializados pela SVS3. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da SVS2 e SVS3 na motilidade espermática. Neste estudo, testamos a hipótese que a SVS2 inibe a motilidade espermática em camundongos, e que a SVS3 facilita esses efeitos inibitórios. Também caracterizamos o perfil de expressão e distribuição da SVS2 e SVS3 (RNAm e proteína) no sistema reprodutor de camundongos machos, bem como sua regulação por androgênios. Para isto, processamos órgãos reprodutivos para ensaios de RT-PCR, RT-qPCR, Western blot e imuno-histoquímica, e espermatozoides epididimários para ensaios de imunofluorescência após incubação com a SVS2 e SVS3A murinas recombinantes (SVS2m e SVS3m) ou fluído da glândula seminal. Além disso, para avaliar o impacto da SVS2m e SVS3Am sobre a motilidade espermática, incubamos espermatozoides da cauda do epidídimo com diferentes concentrações de SVS2m e SVS3m recombinantes, isoladas ou em associação, e avaliamos a motilidade pela plataforma CASA (computer-assisted sperm analysis). Nossos resultados demonstraram que SVS2 e SVS3 (RNAm e proteína) são diferencialmente expressos em tecidos reprodutivos de camundongos machos. Os transcritos Svs2 e Svs3 foram detectados na glândula seminal, mas também em outros tecidos do sistema reprodutor, como cauda do epidídimo, ducto deferente, próstata ventral, e no testículo (somente Svs3). Os resultados de Western blot revelaram a expressão da SVS2 pela presença de uma banda única, com massa molecular aparente de 45 kDa na glândula seminal (tecido e fluido). Na cauda do epidídimo, entretanto, observamos a presença de uma banda menor, de ~11 kDa. Para a SVS3, observamos a presença de uma banda de 35 kDa no fluído da glândula seminal. Já em amostras de testículo, cauda do epidídimo e glândula seminal, observamos a presença de múltiplas bandas com massas moleculares aparentes de 40-43, 28-29 e 14 kDa, respectivamente. Análises de RT-qPCR e imunohistoquímica utilizando amostras da glândula seminal de animais em diferentes fases da maturação sexual ou submetidos à orquiectomia bilateral com ou sem reposição hormonal com testosterona (8 mg/kg, s.c.) demonstraram a correlação positiva entre a expressão da SVS2 e SVS3 com os níveis plasmáticos de androgênios. Tanto a SVS2m quanto a SVS3m interagiram com espermatozoides maduros, apresentando sítios de ligação específica na cabeça e flagelo. Observamos que a SVS2m inibiu os parâmetros de motilidade e cinemática espermática de forma dependente da concentração (IC₅₀ = \sim 5 μ M) e tempo de incubação, os quais afetaram a motilidade progressiva e hiperativada. Por outro lado, a SVS3m apresentou apenas efeitos modestos sobre a motilidade hiperativada. Em adição, a SVS3m não demonstrou efeito sinérgico sobre os efeitos inibitórios da SVS2m sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos. Em conjunto, nossos dados demonstram que a SVS2 é um fator endógeno do plasma seminal de camundongos com atividade inibitória da motilidade espermática. Considerando que a SVS2 é a ortóloga murina à SEMG1 humana, propomos a existência de mecanismos conservados para o controle da motilidade espermática a partir de proteínas oriundas do plasma seminal em primatas e roedores. Nossas descobertas abrem novas fronteiras para o estudo do papel das proteínas da família REST na regulação das funções espermáticas, principalmente nos parâmetros de motilidade espermática, bem como sua exploração como alvos para contracepção masculina, utilizando modelos murinos.

ABSTRACT

Seminal plasma proteins play important roles on the regulation of sperm function and male fertility. In primates and rodents, the most abundant proteins in the seminal plasma are the semenogelins (SEMG1 and SEMG2) and seminal vesicle-secreted proteins (SVS2 and SVS3), respectively, which display functional and structural similarities. These proteins are members of the REST (Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed) family, which are abundantly expressed in the seminal vesicles. SEMG1 interacts with the ejaculated spermatozoa, thus inhibiting its motility, capacitation and acrosomal reaction. In turn, SVS2 inhibits capacitation and acrosome reaction in murine spermatozoa. SVS2 inhibitory effects on mouse sperm capacitation and acrosome reaction are potentiated by SVS3. However, little is known about the effects of SVS2 and SVS3 on sperm motility. In this study, we tested the hypothesis that SVS2 inhibits mouse sperm motility, and that SVS3 facilitates these inhibitory effects. We also characterized the expression and distribution profile of SVS2 and SVS3 (mRNA and protein) in the male mouse reproductive tract, as well as their regulation by androgens. We processed reproductive tissues for RT-PCR, qPCR, Western blot and immunohistochemistry assays, and epididymal spermatozoa incubated with recombinant murine SVS2 and SVS3A (SVS2m and SVS3m) or seminal vesicle fluid for immunofluorescence assays. To assess the impact of SVS2m and SVS3m on sperm motility, we incubated spermatozoa with different concentrations of recombinant SVS2m and SVS3m, isolated or in combination, and evaluated their motility parameters using the computer-assisted sperm analysis (CASA). Our results demonstrated that SVS2 and SVS3 (mRNA and protein) are differentially expressed in male mouse reproductive tissues. Svs2 and Svs3 transcripts were detected in the seminal vesicle, but also testis (only Svs3), cauda epididymis, vas deferens and ventral prostate. Western blot results revealed the expression of SVS2 by the presence of a single band, with apparent molecular mass of 45 kDa in the seminal vesicle (tissue and fluid). In cauda epididymis protein extracts, however, we observed the presence of a smaller band with apparent molecular mass of 11 kDa. For SVS3, we observed the presence of a 35-kDa-band in the seminal vesicle fluid. In testis, epididymis and seminal vesicle samples, however, we observed the presence of multiple bands with apparent molecular masses of 40-43, 28-29 and 14 kDa depending on the tissue analyzed. RT- gPCR and immunohistochemistry analyzes using seminal vesicle samples from animals at different stages of sexual maturation or subjected to bilateral orchiectomy with or without hormone replacement with testosterone (8 mg/kg, s.c.) demonstrated that both Svs2 and Svs3 are androgen-dependent genes. Both SVS2m and SVS3m bound to the head and flagellum of mature spermatozoa. We observed that SVS2m inhibited sperm motility and kinematics in a concentration- $(IC50 = ~5 \mu M)$ and time-dependent manner, thus leading to an inhibition of progressive motility and hyperactivation. On the other hand, SVS3m displayed modest effects on hyperactivated, but not progressive, motility. Furthermore, SVS3m did not demonstrate a synergistic effect on the inhibitory effects of SVS2m on mouse sperm motility. Altogether, our data demonstrate that SVS2 is a seminal plasma-derived inhibitory factor of mouse sperm motility. Since SVS2 is the murine orthologue of human SEMG1, we propose the existence of conserved mechanisms for the control of sperm motility endogenous to the seminal plasma in primates and rodents. Our findings open new frontiers for the study on the roles of REST proteins on the regulation of sperm functions, which could be explored for the development of new targets for male contraception, using murine models.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AR: receptores de andrógenos ACs: adenilato ciclase solúvel AMPc: adenosina monofosfato cíclico BSA: albumina de soro bovina CASA: computer-assisted sperm analysis, do inglês Ct: cycle threshold, do inglês EPPIN: Inibidor de protease epididimário iRMI: índice de inibição relativa da motilidade mAChR: Muscarinic acetylcholine receptors, do inglês PKA: protein Kinase A, do inglês Ppia: ciclofilina A PSA: antígeno prostático específico REST: Rapid evolving seminal-vesicle-transcribed, do inglês Rps18: proteína ribossomal S18 SEMG1: semenogelina-1 SEMG2: semenogelina-2 SVS1: seminal vesicle secretory protein 1, do inglês SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês SVS3A: seminal vesicle secretory protein 3A, do inglês SVS3B: seminal vesicle secretory protein 3B, do inglês SVS4: seminal vesicle secretory protein 4, do inglês SVS5: seminal vesicle secretory protein 5, do inglês SVS6: seminal vesicle secretory protein 6, do inglês SVS7: seminal vesicle secretory protein 7, do inglês TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

Sumário

1.	Introdução	7
	1.1. Espermatozoides	7
	1.2. Processos pós-testiculares de maturação espermática: aquisição de motilidade e capacidade de fertilização	. 12
	1.3. Glândula seminal	.16
	1.4. Proteínas REST's (Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed)	.18
2.	Objetivos	. 25
	2.1. Objetivo geral	.25
	2.2. Objetivos específicos	.25
3.	Material e métodos	. 26
	3.1. Estratégias experimentais	.26
	3.2. Reagentes	. 28
	3.3. Animais	. 30
	3.4. Orquiectomia bilateral	. 30
	3.5. Coletas dos órgãos	. 31
	3.6. Extração do RNA total	. 31
	3.7. Reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia convencional (PCR)	. 32
	3.8. Ensaios de PCR em tempo real (qPCR)	. 32
	3.9. Ensaios Western blot	. 35
	3.10. Ensaios de imuno-histoquímica	. 36
	3.11. Ensaios de Imunofluorescência	. 37
	3.12. Ensaios de análise da motilidade espermática	. 38
	3.13. Análise estatística	. 41
4.	Resultados	42
	4.1. Os genes Svs2 e Svs3 são diferencialmente expressos em tecidos reprodutivos de camundongos machos	. 42
	4.2. A expressão dos genes Svs2 e Svs3 é diferencialmente regulada por androgênios na glândula seminal	. 45
	4.3. SVS2 nativa e recombinante e SVS3A recombinante interagem com espermatozoides maduros	3 49
	4.4. SVS2 murina recombinante inibe a motilidade de espermatozoides de camundongos vitro	in 52
	4.5. SVS3A murina recombinante reduz parâmetros de vigorosidade, mas não afeta a motilidade de espermatozoides de camundongos	. 54
	4 6. A SVS3A recombinante não possui efeito sinérgico sobre os efeitos inibitórios da SVS recombinante sobre a motilidade espermatozoides de camundongos	52 . 57
5.	Discussão	. 60
6.	Conclusão	. 70

7. Referências bibliográficas	71
Anexo I	I
Anexo II	
Anexo III	III

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Espermatozoides

Os espermatozoides são células flageladas, altamente especializadas, que apresentam características morfológicas e funcionais únicas, as quais os tornam capazes de entregar o material genético masculino ao oócito durante a reprodução (Eddy, 2006). Em mamíferos, os espermatozoides são as únicas células especializadas produzidas pelo macho cujo objetivo final é alcançado no organismo da fêmea (Freitas *et al.*, 2017). A produção dos espermatozoides se dá no epitélio dos túbulos seminíferos e envolve uma série de processos de divisão celular mitótica e meiótica e de citodiferenciação, conhecida como espermatogênese (Figura 1). Este processo é finamente regulado por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, dentre os quais os androgênios (testosterona e diidrotestosterona) são absolutamente fundamentais (O'Donnell *et al.*, 2006). Em humanos, a espermatogênese é concluída no início da puberdade e continua ao longo da vida. Em homens adultos férteis, esse processo resulta na produção de cerca de 1.000 espermatozoides por segundo, os quais são liberados do epitélio seminífero para a luz tubular (O' BRYAN, 2016, p. 2328). A duração da espermatogênese varia conforme a espécie, sendo de aproximadamente 64 e 35 dias no homem e camundongo, respectivamente (O'Donnell *et al.*, 2006; de Kretser *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2016).

Durante a espermatogênese de mamíferos, observa-se a presença de diversos tipos de células germinativas: espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Essas células são distribuídas de maneira altamente organizada ao longo do epitélio seminífero, formando arranjos específicos de diferentes tipos celulares do compartimento basal para o apical, conhecidos como estágios da espermatogênese (de Kretser *et al.*, 2016). Em humanos e camundongos são conhecidos 12 estágios da espermatogênese, os quais compõem um ciclo espermatogênico (Figura 1) (Hess & de Franca, 2008; Muciaccia *et al.*, 2013).

Localizadas no compartimento basal do epitélio seminífero, as espermatogônias são as células mais imaturas da linhagem espermatogênica, sendo classificadas em dois tipos: A e B,

de acordo com o padrão da cromatina nuclear (Figura 1). Em humanos, as espermatogônias tipo A são subdivididas em Ad (do inglês, *dark*) e Ap (do inglês, *pale*). As espermatogônias tipo Ap se dividem por mitose, renovando sua população e dando origem às espermatogônias tipo B (Figura 1) (Schlatt & Ehmcke, 2014). As espermatogônias tipo B se proliferam por uma série de divisões mitóticas, originando uma grande população de células germinativas disponíveis para a próxima etapa da espermatogênese (O'Donnell *et al.*, 2006). Esta ocorre pelo início da primeira divisão meiótica (meiose I), caracterizada pela produção do espermatócito primário preleptóteno a partir da espermatogônias tipo B (O'Donnell *et al.*, 2006). Conforme a fase da meiose I, o espermatócito preleptóneno se diferencia sequencialmente em espermatócito zigóteno, paquíteno e diplóteno. O final da meiose I gera os espermatócitos secundários, que rapidamente passam pela segunda divisão meiótica (meiose II), originando as espermátides redondas haploides, estágio a partir do qual não há mais divisão celular.

A espermiogênese é o processo caracterizado por diferentes etapas de citodiferenciação, no qual as espermátides redondas se diferenciam em espermátides alongadas (Figura 1). As etapas da espermiogênese variam conforme a espécie, sendo identificadas 14 e 16 etapas em humanos e camundongos, respectivamente (Figura 1) (O'Donnell *et al.*, 2006). A espermiogênese envolve a formação e desenvolvimento do acrossoma e flagelo, condensação da cromatina, remodelamento e alongamento nuclear (Figura 1) (Eddy, 2006; Schlatt & Ehmcke, 2014). A fase final da espermatogênese é a espermiação, na qual ocorre a perda do excesso de citoplasma da espermátide, e a liberação do espermatozoide na luz do túbulo seminífero (Eroschenko, 2013; Schlatt & Ehmcke, 2014; de Kretser *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2016).



Figura 1. Diagrama da espermatogênese em homens (**A**) e camundongos (**B**), demonstrando os tipos de células espermatogênicas presentes em cada estágio do epitélio seminífero. Ad (espermatogônia tipo Ad – do inglês *dark*); Ap (espermatogônia tipo Ap – do inglês pale); B (espermatogônia tipo B); pL (espermatócitos preleptótenos); L (espermatócitos em fase leptóteno); Z (espermatócitos zigótenos); eP (espermatócitos paquítenos iniciais); mP (espermatócitos paquítenos intermediáros); IP (espermatócitos diplótenos); SS (espermatócitos secundários); 1-14 (painel A, estágios da espermiogênese humana); 1-16 (painel B, estágios da espermiogênese murina). Adaptado de Russell *et al.* (1990); Muciaccia *et al.* (2013).

VII

VIII

IX

Х

XI

XII

Bn

VI

mIn

II-III

I

Inn

IV

v

Os espermatozoides são divididos morfologicamente em dois compartimentos principais: cabeça e flagelo, separados pela peça de conexão (Figura 2A). A cabeça é dividida em região acrossômica, segmento equatorial e região pós-acrossômica (Figura 2A) (Mortimer, 2018). O acrossoma possui lisossomos e diversas enzimas proteolíticas, como hialuronidases e proteases que auxiliam a penetração do espermatozoide nas células do cumulus e zona pelúcida que circundam o oócito (Eroschenko, 2005, p. 410). O núcleo da cabeça do espermatozoide é composto por uma cromatina altamente condensada, na qual protaminas formam ligações conferindo alta estabilidade ao DNA, protegendo-o contra danos (Mortimer, 2018).

O flagelo é dividido em peça intermediária, peça principal e peça final (Figura 2A). Estas regiões contêm um complexo central de microtúbulos formando o axonema, que é cercado por fibras densas que se estendem até o final da peça principal (Figura 2B). As fibras densas externas da peça intermediária são envolvidas pela bainha mitocondrial, enquanto que na peça principal, as fibras densas externas são envolvidas pela bainha fibrosa (Figura 2B). Assim como a cabeça, o flagelo é circundado pela membrana plasmática contendo pequena quantidade de citoplasma. Apesar da maioria dos espermatozoides de mamíferos possuírem características gerais semelhantes, há diferenças no formato da cabeça e comprimento flagelar (Eddy, 2006). Por exemplo, a cabeça dos espermatozoides humanos possui formato espatular enquanto que a cabeça dos espermatozoides de roedores (como ratos e camundongos) possui formato falciforme (Figura 2C) (Eddy, 2006).





Figura 2. Aspectos morfológicos e estruturais do espermatozoide humano e murino. (A) Características gerais do espermatozoide. A cabeça do espermatozoide é conectada ao flagelo pela peça de conexão. As regiões do flagelo são a peça intermediária, peça principal e peça final (B) Componentes do citoesqueleto do flagelo de espermatozoides. O axonema se estende da peça de conexão até extremidade distal do flagelo. Consiste em nove pares externos de microtúbulos cercando um par central de microtúbulos. As fibras densas externas se estendem da peça de conexão até a região posterior da peça principal. A bainha fibrosa é composta por duas colunas conectadas por "ranhuras" circunferenciais e envolve o axonema e as fibras densas externas na região da peça principal do flagelo. (C) A região acrossomal da cabeça de espermatozoides de camundongos possui formato falciforme enquanto que em espermatozoides humanos possuem formato espatular. Adaptado de Eddy (2006).

1.2. Processos pós-testiculares de maturação espermática: aquisição de motilidade e capacidade de fertilização

Os espermatozoides recém-liberados pelo epitélio seminífero são células morfologicamente diferenciadas, contudo, ainda incapazes de se mover progressivamente e fertilizar o oócito. Para se tornarem funcionalmente maduros, os espermatozoides precisam passar por dois processos pós-testiculares de maturação: o primeiro, ainda no trato reprodutor masculino, ocorre durante sua passagem pelo epidídimo, sendo denominado maturação espermática; e o segundo ocorre no trato reprodutor feminino, e envolve um conjunto de mudanças funcionais conhecido como capacitação espermática (Freitas *et al.*, 2017; Gervasi & Visconti, 2017).

O epidídimo é responsável por transportar, concentrar, maturar e estocar os espermatozoides até a ejaculação. Este órgão é altamente segmentado, podendo ser dividido anatomicamente em quatro principais regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Cada região epididimária exibe expressão gênica diferenciada e mantém composições distintas de proteínas, íons e outros componentes do conteúdo luminal, os quais desempenham papeis fundamentais na maturação espermática (Gervasi & Visconti, 2017). De fato, durante o trânsito pelo epidídimo, espermatozoides sofrem alterações em seu teor de açúcares, proteínas e lipídeos (Robaire & Hinton, 2015). Outro processo importante que ocorre nos espermatozoides durante a maturação no epidídimo é a alteração no estado de fosforilação de diferentes proteínas, como por exemplo, a IZUMO1, uma proteína essencial para a fusão do espermatozoide com o oócito (Inoue et al., 2005). Como resultado final do processo de maturação espermática epididimária, os espermatozoides adquirem a habilidade do movimento progressivo, para sua ascensão pelo trato reprodutor feminino, bem como de passar pela segunda etapa da maturação pós-testicular: a capacitação (Robaire & Hinton, 2015). Os espermatozoides maduros são armazenados em estado quiescente na cauda do epidídimo até a ejaculação.

Após a ejaculação, os espermatozoides precisam permanecer um determinado período no sistema reprodutor feminino antes de se tornarem capazes de fertilizar o oócito. Esta

observação, primeiramente descrita por Chang (1951) e Austin (1952), foi denominada capacitação espermática. Trata-se de um evento fundamental para a fertilidade, pois confere ao espermatozoide a capacidade de sofrer reação acrossômica e fertilizar o oócito. Durante a capacitação, os espermatozoides passam por alterações fisiológicas e bioquímicas, incluindo mudanças na composição da membrana plasmática e em seu potencial elétrico, além de ativação de vias de sinalização intracelular, que culminam dentre outros efeitos na fosforilação de proteínas do citoesqueleto e de membrana (FLORMAN; DUCIBELA, 2006, p. 57). De fato, a capacitação espermática está correlacionada com, dentre outras mudanças, aumento do pH intracelular e alterações na fluidez da membrana plasmática (Visconti et al., 1995; Florman & Ducibella, 2006; Ickowicz et al., 2012). O aumento da fluidez da membrana plasmática é promovido pela remoção de esteróis por moléculas como a albumina (Davis, 1980). A alteração da fluidez da membrana facilita o aumento de sua permeabilidade aos íons cálcio (Ca2+) e bicarbonato (HCO₃), componentes importantes para a ativação da via adenilato ciclase solúvel (ACs)/adenosina monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinase A (PKA, do inglês, protein kinase A) e consequentemente a fosforilação de resíduos de serina e treonina (Davis, 1980; Visconti et al., 1995; Visconti et al., 2011; Aitken & Nixon, 2013). Além disso, fosforilação de resíduos de tirosina também está correlacionada à capacitação e à regulação da motilidade espermática (Visconti et al., 1995; Mizrahi & Breitbart, 2014).

Sabe-se que a sinalização associada à capacitação pode ser regulada (estimulada ou inibida) por eventos mediados por interações proteína-proteína na superfície espermática, incluindo aquelas que envolvem a ligação de proteínas do plasma seminal com proteínas espermáticas. Vale ressaltar que a capacitação pode ser mimetizada *in vitro* utilizando meios de cultura apropriados, contendo Ca²⁺, HCO ⁻ e₈ albumina de soro bovino (BSA, do inglês bovine serum albumin), dentre outros componentes (Visconti *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2010).

A motilidade é uma característica primordial do espermatozoide maduro, sendo definida como a propagação de ondas transversais ao longo do flagelo no sentido proximal-distal em relação à cabeça do espermatozoide produzindo uma ação que o impulsiona durante sua jornada pelo trato reprodutor feminino ou após seu isolamento e manutenção em condições

adequadas *in vitro* (Turner, 2005). É reconhecido que a motilidade espermática está diretamente relacionada à capacidade de fertilização do oócito (Guzick *et al.*, 2001). De fato, homens que apresentam alterações na motilidade espermática são subférteis ou inférteis e, geralmente necessitam recorrer às técnicas de reprodução assistida para engravidarem suas parceiras (Turner *et al.*, 1999).

Os espermatozoides de mamíferos, incluindo humanos e camundongos, apresentam padrões distintos de motilidade, sendo que os principais são motilidade ativada (também conhecida como progressiva) e hiperativada (Figura 3). A motilidade progressiva é adquirida durante a maturação dos espermatozoides no epidídimo, e é caracterizada por movimentos flagelares relativamente simétricos e vigorosos, resultando em movimentos rápidos e progressivos (Figura 3) (Suárez & Osman, 1987; Mortimer, 2000; Eddy, 2006). Os espermatozoides que atingem a motilidade hiperativada exibem curvas flagelares assimétricas, batimentos flagelares de alta amplitude e trajetória circular ou irregular (Figura 3). A motilidade hiperativada está correlacionada à capacitação espermática, apesar de serem considerados processos distintos, porém sobrepostos, quanto aos seus respectivos mecanismos moleculares (Suárez & Osman, 1987; Mortimer, 2000; Eddy, 2006). São atribuídos papéis importantes para a fertilidade a este perfil de motilidade, como: eficiência na passagem espermática em ambientes viscosos como o muco do oviducto e, posteriormente, na interação com o oócito (Turner, 2005; Freitas et al., 2017). Além disso, a hiperativação atua como um fator de seleção, pois permite que somente os espermatozoides que passaram pelo processo de capacitação atinjam o local da fertilização (Eddy, 2006; Florman & Ducibella, 2006; Freitas et al., 2017).



Hiperativado

Figura 3. Principais padrões de motilidade de espermatozoides humanos e murinos. A motilidade progressiva é observada em espermatozoides recém ejaculados ou isolados da cauda do epidídimo, caracteriza-se por movimentos flagelares simétricos e vigorosos. A motilidade hiperativada está associada ao processo de capacitação espermática, é caracterizada por curvas flagelares assimétricas, batimentos flagelares de alta amplitude e trajetória circular ou irregular. Adaptado de Florman & Ducibella (2006).

Diversas proteínas espermáticas estão envolvidas na regulação da motilidade, como por exemplo, proteínas de citoesqueleto, canais iônicos e proteínas que atuam na sinalização de cálcio, metabolismo e fosforilação (Turner, 2005). Até o momento, o principal mecanismo de sinalização que regula a motilidade espermática em mamíferos envolve a ativação da ACs pelo Ca²⁺ e HCO3⁻ e, consequentemente, o aumento dos níveis intracelulares de AMPc, resultando na fosforilação de resíduos de serina/treonina de proteínas do flagelo pela PKA (Suárez & Osman, 1987; Turner, 2005; Xia *et al.*, 2007). Apesar da importância da motilidade e da capacitação espermática para a reprodução, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação. Dessa forma, avançar no conhecimento sobre os fatores envolvidos no seu desencadeamento e regulação é de suma importância para o entendimento da fisiologia do espermatozoide e, consequentemente da fertilidade masculina (Eddy, 2006). Essas descobertas podem, por exemplo, ser exploradas para o desenvolvimento de novas terapias para infertilidade ou ainda como alvos farmacológicos para a contracepção masculina. Um ponto que merece destaque é o papel regulatório de proteínas presentes no plasma seminal, incluindo aquelas secretadas pela glândula seminal, sobre a motilidade e capacitação espermáticas.

1.3. Glândula seminal

A glândula seminal é uma das glândulas sexuais acessórias integrantes do sistema reprodutor masculino de alguns mamíferos, incluindo homens e camundongos. Nessas espécies, um par de glândulas seminais está localizado posteriormente à bexiga urinária e superiormente à próstata. Cada glândula mede aproximadamente 6 cm e 2,5 cm em humanos e camundongos, respectivamente (Setchell & Breed, 2006). O ducto excretor da glândula seminal se conecta à região terminal do ducto deferente através da próstata desembocando na uretra prostática (Figura 4) (Eroschenko, 2013). Em camundongos, anexas à curvatura menor das glândulas seminais encontram-se as glândulas coaguladoras (Figura 4B). Nessa espécie, a combinação das secreções das glândulas seminal e coaguladora formam o plugue copulatório vaginal, que atua como uma barreira física, prevenindo que outros machos copulem com a fêmea, e como reservatório de espermatozoides no trato reprodutor feminino (Schneider *et al.*, 2016).

Assim como o epidídimo e o ducto deferente, a glândula seminal é derivada do ducto mesonéfrico (também conhecido como ducto de Wolff) durante o desenvolvimento embrionário. Em camundongos após o 15° dia de gestação é possível observar a expansão do epitélio distal do ducto mesonéfrico, marcando a estrutura que, posteriormente, dará origem a glândula seminal (Curry & Atherton, 1990). O desenvolvimento tecidual e a função secretora da glândula seminal são dependentes da secreção de androgênios testiculares (Curry & Atherton, 1990; Gonzales, 1994). As células da glândula seminal expressam o receptor de androgênios (AR), que são alvos da di-hidrotestosterona (DHT), metabólito ativo da testosterona, que atua como um potente agonista do AR (Simanainen *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2010). De fato, a orquiectomia em ratos e camundongos adultos resulta em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas na glândula seminal, como atrofia, aumento no índice apoptótico das células epiteliais, remodelamento dos componentes da matriz extracelular, e interrupção da atividade secretora do epitélio (Chung & Ferland-Raymond, 1975; Nishino *et al.*, 2004; Justulin *et al.*, 2006). A reposição hormonal com testosterona promove a restauração da arquitetura e da

atividade secretora da glândula seminal (Chung & Ferland-Raymond, 1975; Nishino *et al.*, 2004; Justulin *et al.*, 2006).

O epitélio da glândula seminal é altamente convoluto e irregular (Figura 4C). Sua mucosa possui dobras que se ramificam em várias dobras secundárias, formando cavidades irregulares, estas dobras se estendem até a luz tubular (Figura 4C). Seu epitélio é pseudoestratificado e colunar ou cuboide e suas células epiteliais contêm grânulos secretores e núcleo basal (Eroschenko, 2013). O músculo liso da glândula seminal consiste em uma camada muscular circular interna e uma camada muscular longitudinal externa (Figura 4C). A camada adventícia circunda o músculo liso e se funde com o tecido conectivo (Figura 4C) (Eroschenko, 2013). As camadas musculares lisas são inervadas por fibras noradrenérgicas e colinérgicas. As funções da inervação autônoma na glândula seminal envolvem o controle da contratilidade da musculatura lisa e da atividade secretora do epitélio (Mendes et al., 2004). No músculo liso da glândula seminal de ratos estão presentes os subtipos M₂ e M₃ do receptor muscarínico de acetilcolina (mAChR) (Hamamura et al., 2006; Avellar et al., 2009). Receptores adrenérgicos também foram detectados em células epiteliais e da musculatura lisa da glândula seminal de ratos, de forma predominantemente o receptor α₁-adrenérgico (Shima, 1992; Queiróz et al., 2008). Os três subtipos de adrenoceptores- α_1 (α_{1A} , $\alpha_{1B} \in \alpha_{1D}$) estão presentes na glândula seminal de ratos, no entanto, a contração da glândula seminal é predominantemente induzida via adrenoceptores- α_{1A} (Silva *et al.*, 1999).

Os fluídos secretados pelos órgãos sexuais acessórios estão envolvidos na regulação da função espermática, incluindo motilidade, capacitação e fertilização, além de atuarem na proteção do espermatozoide contra ameaças patogênicas, metabólicas e imunológicas durante sua jornada pelo trato reprodutor feminino (Robert & Gagnon, 1999; Mendes *et al.*, 2004; Simanainen *et al.*, 2008; Juyena & Stelletta, 2012). A glândula seminal é responsável por secretar aproximadamente 70% do volume do plasma seminal, fração do sêmen que exclui os espermatozoides, o qual é composto por 1) íons; 2) compostos de baixo peso molecular, como frutose e prostaglandinas; e 3) proteínas diversas. Estes componentes proporcionam um ambiente propício para a viabilidade e potencial fértil dos espermatozoides (Curry & Atherton,

1990; Aumüller & Riva, 1992; Robert & Gagnon, 1999; Stark *et al.*, 2005; de Lamirande, 2007). De fato, a remoção cirúrgica da glândula seminal em camundongos implica em subfertilidade, em consequência de falha da formação do plugue copulatório e redução do número de espermatozoides viáveis para fertilização no sistema reprodutor feminino (Peitz & Olds-Clarke, 1986; Kawano *et al.*, 2014). Este efeito negativo para a fertilidade está relacionado com ausência de proteínas secretadas pela glândula seminal, que são essenciais para o controle da função espermática, como por exemplo, as proteínas da família REST (do inglês, *Rapidly- evolving seminal vesicle-transcribed*), que serão destacadas a seguir.



Figura 4. Glândula seminal e outras glândulas sexuais acessórias de roedores e humanos. **(A, B)** Visão frontal superior de glândulas sexuais acessórias humana (A) e murina (B). **(C)** Secção histológica transversal da glândula seminal humana. Corte longitudinal corado com hematoxilina e eosina demonstrando as principais regiões da glândula seminal. Adaptado de Setchell & Breed (2006), Eroschenko (2013); e (McKay *et al.*, 2020).

1.4. Proteínas REST's (Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed)

Na maior parte dos mamíferos, incluindo roedores e primatas, as proteínas codificadas

pelos genes da família REST, secretadas pela glândula seminal, são os componentes mais

abundantes do plasma seminal, sendo essenciais para a formação do coágulo de sêmen e para a fertilidade (Peitz & Olds-Clarke, 1986; Kawano *et al.*, 2014). Os efeitos das proteínas REST's sobre a função espermática são mediados pela sua interação com o gameta masculino. De fato, estudos demonstraram a capacidade de proteínas REST's humanas e de roedores de se ligarem à superfície de espermatozoides maduros (Manco & Abrescia, 1988; Bjartell *et al.*, 1996; Carballada & Esponda, 1998; Yoshida *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Kawano & Yoshida, 2007; Araki *et al.*, 2016).

Em humanos, as principais proteínas REST's são as semenogelinas (SEMGs), que se destacam do ponto de vista clínico. São conhecidas duas isoformas: SEMG1 e SEMG2, codificadas por genes distintos localizados no cromossomo 2 humano (Peitz & Olds-Clarke, 1986; Ulvsback *et al.*, 1992; Robert & Gagnon, 1999) (Figura 6). A SEMG1 e SEMG2 foram detectadas na cabeça (região acrossômica e pós-acrossômica) e no flagelo (peças intermediária e principal) de espermatozoides recém-ejaculados (Bjartell *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005), onde atuam no controle da função espermática.

Durante a ejaculação, as contrações da musculatura lisa da cauda do epidídimo e do ducto deferente empurram os espermatozoides em direção ao canal ejaculatório, onde são banhados pela secreção da vesícula seminal. Em seguida, o fluído seminal contendo os espermatozoides entra na uretra prostática, mistura-se com as secreções da próstata e da glândula bulbouretral, sendo finalmente ejetado pelo pênis (Robert & Gagnon, 1999). Imediatamente após a ejaculação, o sêmen forma uma massa viscosa conhecida como coágulo de sêmen, que mantém os espermatozoides imóveis no seu interior (Robert & Gagnon, 1999). A SEMG1 é um dos componentes integrais do coágulo se sêmen, sendo sua interação com os espermatozoides um evento crucial para mantê-los estáticos (Robert & Gagnon, 1996; Mitra *et al.*, 2010). Fisiologicamente, a motilidade do espermatozoide humano é ativada após a degradação da SEMG1 pela serino-protease prostática PSA, processo que resulta na liquefação do sêmen (O'Rand *et al.*, 2011). Um esquema sobre o destino da SEMG1 após a ejaculação foi apresentado na figura 5.

Sistema reprodutor masculino



Figura 5: Diagrama simplificado das funções espermáticas no sistema reprodutor masculino e feminino de mamíferos. Proteínas SEMG1, PSA e Zn²⁺ misturam-se durante a ejaculação. SEMG1 coagula o sêmen e imobiliza os espermatozoides. Diminuição da concentração de Zn²⁺ no coágulo pode ativar a PSA. PSA cliva SEMG1 e liquefaz o coágulo do sêmen ocasionando a ativação da motilidade espermática. A remoção dos fragmentos de SEMG1 da superfície dos espermatozoides permite sua capacitação e, posterior fertilização do oócito. Adaptado de Yoshida *et al.* (2008b).

A relevância da SEMG1 para a fertilidade foi reconhecida por: 1) quadros de infertilidade ou subfertilidade em homens com alterações no tempo de liquefação do sêmen (Robert & Gagnon, 1999); e 2) correlação positiva entre o nível de expressão do transcrito *SEMG1* e infertilidade masculina associada à baixa motilidade espermática de origem idiopática (Yu et al., 2013). A modulação negativa na motilidade dos espermatozoides pela SEMG1 ocorre via interação com a proteína de superfície espermática EPPIN (do inglês, *Epididymal peptidase inhibitor*). Os mecanismos pelos quais a SEMG1 inibe a motilidade espermática via interação com a EPPIN ainda carecem de elucidação, mas parecem envolver a modulação dos níveis de cálcio e AMPc intracelulares (O'Rand *et al.*, 2009; O'Rand & Widgren, 2012). Devido ao seu papel crucial no controle da motilidade espermática, a sequência da EPPIN responsável pela interação com a SEMG1 vem sendo explorada para o desenvolvimento de fármacos contraceptivos masculinos que mimetizam os efeitos da SEMG1 no espermatozoide (O'Rand *et al.*, 2011; O'Rand *et al.*, 2016).

Em camundongos, os membros da família REST são as SVS's (do inglês, *seminal vesicle-secretory proteins*). Oito SVS's (SVS1, SVS2, SVS3A, SVS3B, SVS4, SVS5, SVS6 e SVS7) foram descritas no sêmen de camundongos, sendo codificadas por genes diferentes. Os genes *Svs2, Svs3a, Svs3b, Svs4, Svs5* e *Svs6* estão localizados em um cluster no cromossomo 2 murino em *loci* gênicos ortólogos aos dos genes *SEMG1* e *SEMG2*, que por sua vez, estão no cromossomo 20 humano (Clauss *et al.*, 2005) (Figura 6). Apesar de codificadas por genes diferentes, a SVS3A e SVS3B são altamente conservadas, apresentando o mesmo número de resíduos de aminoácidos (265), dos quais apenas cinco são diferentes (Anexo II). Por questões didáticas, a seguir nos referimos a ambas as proteínas como SVS3, exceto quando indicado. Os genes *Svs* evoluíram rapidamente por duplicação e apresentam várias funções, estando envolvidos na: 1) formação do plugue copulatório (SVS1-SVS3) (Mangels *et al.*, 2015); 2) regulação da resposta anti-inflamatória e imunológica (SVS4) (Galdiero *et al.*, 1989) (Metafora *et al.*, 1989); 3) inibição da atividade de serino-proteases (SVS5 e SVS6) (Clauss *et al.*, 2005); e 4) modulação das funções espermáticas, incluindo motilidade (SVS7) e capacitação (SVS2 e SVS3) (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2014; Araki *et al.*, 2016).

Apesar do baixo grau de conservação da sequência primária dos seus produtos proteicos, os genes *Svs2* e *Svs3* (*Svs3a* e *Svs3b*) murinos são considerados ortólogos aos *SEMG1* e *SEMG2* humanos, respectivamente, pois compartilham similaridades estruturais e funcionais (Tabela 1). Assim como a SEMG1 humana, SVS2 é o componente mais abundante do plasma seminal murino e, em associação com SVS1 e SVS3, atua na formação do plugue copulatório (Kawano & Yoshida, 2007; Mangels *et al.*, 2015). Dentre as similaridades estruturais entre os genes *SEMG1* e *SEMG2* humanos e *Svs2 e Svs3* murinos estão: a composição de três éxons e dois íntrons curtos, no qual o primeiro éxon codifica o peptídeo sinal, o segundo, a proteína madura, e o terceiro, a região 3'-UTR (Ulvsback *et al.*, 1992; Lundwall & Clauss, 2011). Além disso, as SEMG1 e SEMG2 humanas, e SVS2 e SVS3 murinas são substratos para calicreínas da família da PSA e transglutaminases, possuem alto ponto isoelétricos (SEMG1: 9,30; SVS2: 9,89; SVS3A: 9,39 e SVS3B: 9,37), seus resíduos de aminoácidos com repetições imperfeitas *in tandem* em sua estrutura primária, são ricas em glutamina, serina, glicina e lisina e contêm

de um a três resíduos de cisteína em sua estrutura primária (SEMG1: C239; SEMG2: C159 e C360; SVS2: C97; e SVS3: C98, C249 e C 251) (Figura 6) (Jensen-Seaman & Li, 2003; Kawano & Yoshida, 2007; Lundwall & Clauss, 2011; Shindo *et al.*, 2019).

Camundongos machos com deleção do gene Svs2 são subférteis devido à ausência do plugue copulatório e morte prematura dos espermatozoides no útero, o que indica o seu papel essencial para a fertilidade masculina (Kawano et al., 2014; Araki et al., 2015; Shindo et al., 2019). Em adição, Kawano et al. (2007) demonstraram que espermatozoides murinos recémejaculados, coletados da vagina e do útero, apresentaram a SVS2 em sua superfície. Em contrapartida, esses autores não detectaram a SVS2 em espermatozoides capacitados, coletados do oviducto, sugerindo que SVS2 pode atuar como fator decapacitante, prevenindo a capacitação precoce até que o espermatozoide alcance o oviduto (Kawano & Yoshida, 2007). O mecanismo de ação da SVS2 neste evento envolve, pelo menos em parte, a manutenção dos níveis de colesterol da membrana espermática (Araki et al., 2015). Dados recentes do nosso laboratório sugeriram um novo possível mecanismo pelo qual a SVS2 modula a função do espermatozoide murino: via interação com a EPPIN (Mariani et al., 2020). Demonstramos que a SVS2 e a EPPIN são proteínas de interação na superfície do espermatozoide murino, sustentando a hipótese de conservação funcional entre a interação EPPIN-SEMG1 humana e EPPIN-SVS2 murina na função espermática (Mariani et al., 2020). Interessantemente, a SVS3 interage diretamente com a SVS2 na superfície espermática facilitando seus efeitos inibitórios sobre a capacitação in vitro (Araki et al., 2016). Resultados do nosso grupo corroboraram essa observação pela demonstração de que a SVS3 faz parte de um complexo proteico juntamente com a SVS2 e a EPPIN no espermatozoide de camundongos (Mariani et al., 2020). Esses dados sustentam a hipótese de uma ação sinérgica entre proteínas SVS's no controle da função espermática (Araki et al., 2016).



Α



В



Figura 6. Aspectos estruturais das proteínas REST's: SEMG1 e SEMG2 humanas e SVS2 e SVS3 murinas. **(A)** Localização dos genes *SEMG1* e *SEMG2* sub-*locus* centromérico do cromossomo 20 humano. Os genes *Svs2, Svs3a* e *Svs3b* murinos estão localizados em *loci* ortólogos cromossomo 2, juntamente com outros genes da família *Svs.* **(B)** Sequências primárias da SEMG1 (NP_002998), SEMG2 (NP_002999), SVS2 (NP_059086) e SVS3A (NP_001298043). Os peptídeos sinais são as sequências mais conservadas entre as SEMGs humanas e SVSs murinas e estão representados em letras minúsculas cinzas. As sequências sublinhadas, em negrito, em laranja, em azul ou em vermelho representam repetições *in tandem* de sequências de aminoácidos nas suas estruturas primárias (LIN *et al.*, 2012). As sequências com realce amarelo na SEMG1 e SEMG2 representam sequências que se repetem nas suas estruturas primárias (LILJA *et al.*, 1989). O resíduo único de cisteína da SEMG1 está contornado em formato de caixa na posição 239, enquanto na SEMG2, os resíduos de cisteína estão localizados nas posições 159 e 360. O resíduo único de cisteína da SVS2 está contornado em formato de caixa na posição 97, enquanto na SVS3A, os resíduos de cisteína estão contornados em formato de caixa na posições 98, 249 e 251.

Semelhanças estruturais	Semelhanças funcionais
Três éxons e dois íntrons	Formação coágulo de sêmen
Sequência primária contendo repetições <i>in</i> <i>tandem</i>	Substratos da PSA
Sequência primária contendo resíduos de cisteína	Interação com o espermatozoide maduro
Alto ponto isoelétrico	Modulação da capacitação espermática

 Tabela 1. Semelhanças estruturais e funcionais entre SVS2-3 murinas e SEMG1-2 humanas

Os dados apresentados demonstram as semelhanças funcionais entre a SEMG1 e SEMG2 humanas com a SVS2 e SVS3 murinas. De fato, considerando o caráter multifuncional das proteínas REST's para a reprodução, avançar no conhecimento dos seus efeitos sobre eventos pré-fertilização associados à função espermática é importante para o melhor entendimento sobre a evolução dos mecanismos que regulam a fertilidade masculina. Pesquisas nessa área apresentam potencial para descobertas de novos alvos terapêuticos tanto para o tratamento da infertilidade quanto para a contracepção masculina, representando fontes de inovação em Farmacologia da Reprodução.

Até o momento, entretanto, os estudos acerca da SVS2 e a SVS3 focaram no seu efeito modulador sobre a capacitação espermática, sendo que seus efeitos sobre a aquisição de motilidade ativada pelos espermatozoides ainda carecem de elucidação. Considerando nossa descoberta recente de que a EPPIN murina atua como uma "plataforma" para a ligação da SVS2 e SVS3 na superfície do espermatozoide, neste trabalho testamos a hipótese que a SVS2 e a SVS3 atuam como fatores inibitórios da motilidade espermática. Além disso, também investigamos o perfil de expressão e regulação androgênica da SVS2 e SVS3 em camundongos.

6. Conclusão

6. Conclusão

Neste trabalho, demonstramos que a SVS2 atua como um fator endógeno do plasma seminal para a inibição da motilidade espermática, adicionando mais um papel para essa proteína no controle da função do gameta masculino. O efeito inibitório da SVS2 sobre a motilidade ativada e hiperativada do espermatozoide murino não depende da presença da SVS3. Por outro lado, a SVS3 apresentou efeitos modestos sobre parâmetros que controlam o vigor do movimento espermático, sugerindo que ela pode atuar como uma moduladora da motilidade hiperativada. Tendo em vista que a SEMG1 e a SVS2 são proteínas homólogas, propomos a existência de fatores similares derivados do plasma seminal para o controle motilidade espermática em primatas e roedores.

Nossas descobertas abrem novas fronteiras para o estudo do papel das proteínas da família REST na regulação das funções espermáticas, principalmente nos parâmetros que controlam a motilidade ativada e hiperativada. Portanto, novas estratégias experimentais com potenciais aplicações para potencialização ou inibição da fertilidade masculina poderão ser exploradas, favorecendo ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento da infertilidade ou ao desenvolvimento de um novo contraceptivo masculino não-hormonal.

7. Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

Abbott, D. E.; Pritchard, C.; Clegg, N. J.; Ferguson, C. et al. Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate. **Genome Biol**, v. 4, n. 12, p. R79, 2003. doi. 10.1186/gb-2003-4-12-r79.

Aitken, R. J.; Nixon, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. **Mol Hum Reprod**, v. 19, n. 12, p. 785-93, 2013. doi. 10.1093/molehr/gat067.

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 Mice1. **Biol Reprod**, v. 92, n. 1, p. 8, 1-10-8, 1-10, 2015. doi. 10.1095/biolreprod.114.120642.

Aumüller, G.; Riva, A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. **Andrologia**, v. 24, n. 4, p. 183-96, 1992. doi. 10.1111/j.1439-0272.1992.tb02636.x.

Austin, C. R. The `Capacitation' of the mammalian sperm. **Nature**, v. 170, n. 4321, p. 326-26, 1952. doi.

Avellar, M. C.; Lazari, M. F.; Porto, C. S. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 321-44, 2009. doi. S0001-37652009000300002 [pii].

Belleannée, C.; Thimon, V.; Sullivan, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 3, p. 717-31, 2012. doi. 10.1007/s00441-012-1381-0.

Bjartell, A.; Malm, J.; Moller, C.; Gunnarsson, M. et al. Distribution and tissue expression of semenogelin I and II in man as demonstrated by in situ hybridization and immunocytochemistry. **J Androl**, v. 17, n. 1, p. 17-26, 1996. doi.

Bourgeon, F.; Evrard, B.; Brillard-Bourdet, M.; Colleu, D. et al. Involvement of Semenogelin-Derived Peptides in the Antibacterial Activity of Human Seminal Plasma. **Biol Reprod**, v. 70, n. 3, p. 768-74, 2004. doi. 10.1095/biolreprod.103.022533.

Carballada, R.; Esponda, P. Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa in vivo and in vitro. **Int J Androl**, v. 21, n. 1, p. 19-28, 1998. doi. 10.1046/j.1365-2605.1998.00082.x.

Chang, M. C. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. **Nature**, v. 168, p. 697, 1951. doi. 10.1038/168697b0.

Chung, L. W.; Ferland-Raymond, G. Differences among rat sex accessory glands in their neonatal androgen dependency. **Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 145-53, 1975. doi. 10.1210/endo-97-1-145.

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.

Curry, P. T.; Atherton, R. W. Seminal vesicles: development, secretory products, and fertility. **Arch Androl**, v. 25, n. 2, p. 107-13, 1990. doi. 10.3109/01485019008987601.

Davis, B. K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Arch Androl**, v. 5, n. 3, p. 249-54, 1980. doi. 10.3109/01485018008986993.

de Kretser, D. M.; Loveland, K.; O'Bryan, M. Spermatogenesis. In: Jameson, J. L.;De Groot, L. J.;de Kretser, D. M.;Giudice, L. C.;Grossman, A. B.;Melmed, S.;Potts, J. T.; Weir, G. C. (Ed.). **Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2016. p.2325-53.e9.

de Lamirande, E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 33, n. 1, p. 60-8, 2007. doi. 10.1055/s-2006-958463.

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.

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.

Eroschenko, V. P. **Atlas of histology with functional correlations**. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2013.

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.

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.

Gao, S.; Wu, H.; Wang, F.; Wang, Z. Altered differentiation and proliferation of prostate epithelium in mice lacking the androgen receptor cofactor p44/WDR77. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3941-53, 2010. doi. 10.1210/en.2009-1080.

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.

Gonzales, G. F. Test for androgen activity at the male reproductive tract in infertile men. **Arch Androl**, v. 32, n. 3, p. 235-42, 1994. doi. 10.3109/01485019408987791.

Goodson, S. G.; Zhang, Z.; Tsuruta, J. K.; Wang, W. et al. Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. **Biol Reprod**, v. 84, n. 6, p. 1207-15, 2011. doi. 10.1095/biolreprod.110.088989.

Guzick, D. S.; Overstreet, J. W.; Factor-Litvak, P.; Brazil, C. K. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **N Engl J Med**, v. 345, n. 19, p. 1388-93, 2001. doi. 10.1056/NEJMoa003005.

Hamamura, M.; Marostica, E.; de Avellar, M. C.; Porto, C. S. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the rat seminal vesicle. **Mol Cell Endocrinol**, v. 247, n. 1-2, p. 192-8, 2006. doi. S0303-7207(06)00007-4 [pii]

10.1016/j.mce.2006.01.004.

Harris, S. E.; Harris, M. A.; Johnson, C. M.; Bean, M. F. et al. Structural characterization of the rat seminal vesicle secretion II protein and gene. **J Biol Chem**, v. 265, n. 17, p. 9896-903, 1990. doi.

Hess, R. A.; de Franca, L. R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Cheng, C. Y. (Ed.). **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. New York, NY: Springer New York, 2008. p.1-15.

Hirano, Y.; Shibahara, H.; Obara, H.; Suzuki, T. et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **J Assist Reprod Genet**, v. 18, n. 4, p. 215-20, 2001. doi. 10.1023/a:1009420432234.

Ickowicz, D.; Finkelstein, M.; Breitbart, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian J Androl**, v. 14, n. 6, p. 816-21, 2012. doi. 10.1038/aja.2012.81.

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.

Jensen-Seaman, M.; Li, W.-H. Evolution of the Hominoid Semenogelin Genes, the Major Proteins of Ejaculated Semen. **J Mol Evol**, v. 57, n. 3, p. 261-70, 2003. doi.

Justulin, L. A., Jr.; Ureshino, R. P.; Zanoni, M.; Felisbino, S. L. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 4, p. 354-64, 2006. doi. 10.1016/j.cellbi.2006.01.002.

Juyena, N. S.; Stelletta, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. **J Androl**, v. 33, n. 4, p. 536-51, 2012. doi. 10.2164/jandrol.110.012583.

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, 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.

Lin, H.-J.; Luo, C.-W.; Chen, Y.-H. Localization of the Transglutaminase Cross-linking Site in SVS III, a Novel Glycoprotein Secreted from Mouse Seminal Vesicle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3632-39, 2002. doi. 10.1074/jbc.M107578200.

Lu, S.-H.; Yen, Y.-K.; Ling, T.-Y.; Cheng, K.-T. et al. Capacitation suppression by mouse seminal vesicle autoantigen involves a decrease in plasma membrane Ca2+-ATPase (PMCA)- mediated intracellular calcium. **J Cell Biochem**, v. 111, n. 5, p. 1188-98, 2010. doi. 10.1002/jcb.22844.

Lundwall, A.; Bjartell, A.; Olsson, A. Y.; Malm, J. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 9, p. 805-10, 2002. doi. 10.1093/molehr/8.9.805.

Lundwall, A.; Clauss, A. Genes encoding WFDC- and Kunitz-type protease inhibitor domains: are they related? **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 5, p. 1398-402, 2011. doi. 10.1042/BST0391398.

Lundwall, å.; Peter, A.; Lövgren, J.; Lilja, H. et al. Chemical Characterization of the Predominant Proteins Secreted by Mouse Seminal Vesicles. **Eur J Biochem**, v. 249, n. 1, p. 39-44, 1997. doi. 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00039.x.

Malm, J.; Jonsson, M.; Frohm, B.; Linse, S. Structural properties of semenogelin I. **FEBS J**, v. 274, n. 17, p. 4503-10, 2007. doi.

Manco, G.; Abrescia, P. A major secretory protein from rat seminal vesicle binds ejaculated spermatozoa. **Gamete Res**, v. 21, n. 1, p. 71-84, 1988. doi. 10.1002/mrd.1120210109.

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.

McKay, A. C.; Odeluga, N.; Jiang, J.; Sharma, S. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Seminal Vesicle. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island FL: © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020.

Mendes, F. R.; Hamamura, M.; Queiroz, D. B.; Porto, C. S. et al. Effects of androgen manipulation on alpha1-adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. **Life Sci**, v. 75, n. 12, p. 1449-63, 2004. doi. 10.1016/j.lfs.2004.03.011.

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.

Mizrahi, R.; Breitbart, H. Mitochondrial PKA mediates sperm motility. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 12, p. 3404-12, 2014. doi. 10.1016/j.bbagen.2014.09.005.

Mortimer, D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. **Mol Human Reprod**, v. 24, n. 12, p. 567-92, 2018. doi. 10.1093/molehr/gay040.

Mortimer, S. T. CASA—Practical Aspects. **J Androl**, v. 21, n. 4, p. 515-24, 2000. doi. 10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x.

Muciaccia, B.; Boitani, C.; Berloco, B. P.; Nudo, F. et al. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. **Biol Reprod**, v. 89, n. 3, 2013. doi. 10.1095/biolreprod.113.111682.

Neto, F. T.; Bach, P. V.; Najari, B. B.; Li, P. S. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Semin Cell Dev Biol**, v. 59, p. 10-26, 2016. doi. 10.1016/j.semcdb.2016.04.009.

Nishino, T.; Wedel, T.; Schmitt, O.; Bühlmeyer, K. et al. Androgen-dependent morphology of prostates and seminal vesicles in the Hershberger assay: evaluation of immunohistochemical and morphometric parameters. **Ann Anat**, v. 186, n. 3, p. 247-53, 2004. doi. 10.1016/s0940-9602(04)80011-6.

O'Donnell, L.; Meachem, S. J.; Stanton, P. G.; McLachlan, R. I. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. 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.1017-69.

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.

Peitz, B.; Olds-Clarke, P. Effects of Seminal Vesicle Removal on Fertility and Uterine Sperm Motility in the House Mouse1. **Biol Reprod**, v. 35, n. 3, p. 608-17, 1986. doi. 10.1095/biolreprod35.3.608.

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

Queiróz, D. B.; Porto, C. S.; Grossman, G.; Petrusz, P. et al. Immunolocalization of alpha(1A)adrenoceptors in rat and human epididymis. **Cell Tissue Res**, v. 332, n. 3, p. 509-22, 2008. doi. 10.1007/s00441-008-0576-x.

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. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. **Biol Reprod**, v. 55, n. 4, p. 813-21, 1996. doi. 10.1095/biolreprod55.4.813.

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.

Rueden, C. T.; Schindelin, J.; Hiner, M. C.; DeZonia, B. E. et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 529, 2017. doi. 10.1186/s12859-017-1934-z.

Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Sinha Hikim, A. P.; Clegg, E. D. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Florida: Cache River Press, 1990.

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.

Schlatt, S.; Ehmcke, J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. **Semin Cell Dev Biol**, v. 29, p. 2-16, 2014. doi. http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.007.

Schneider, M. R.; Mangels, R.; Dean, M. D. The molecular basis and reproductive function(s) of copulatory plugs. **Mol Reprod Dev**, v. 83, n. 9, p. 755-67, 2016. doi. 10.1002/mrd.22689.

Setchell, B. P.; Breed, W. G.

Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. 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.771-825.

Shima, S. Effects of androgen on alpha- and beta-adrenergic receptors in membranes from the rat seminal vesicle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1175, n. 1, p. 123-7, 1992. doi. 10.1016/0167-4889(92)90018-7.

Shindo, M.; Inui, M.; Kang, W.; Tamano, M. et al. Deletion of a Seminal Gene Cluster Reinforces a Crucial Role of SVS2 in Male Fertility. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 18, p. 4557, 2019. doi.

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.

Silva, E. J. R.; Queiróz, D. B. C.; Honda, L.; Avellar, M. C. W. Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: Expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. **Mol Cell Endocrinol**, v. 325, n. 1-2, p. 64-77, 2010. doi. 10.1016/j.mce.2010.05.013.

Silva, M. A.; Megale, A.; Avellar, M. C.; Porto, C. S. Expression and pharmacological characterization of alpha1-adrenoceptors in rat seminal vesicle. **Eur J Pharmacol**, v. 381, n. 2-3, p. 141-9, 1999. doi. 10.1016/s0014-2999(99)00563-4.

Simanainen, U.; McNamara, K.; Davey, R. A.; Zajac, J. D. et al. Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3330-8, 2008. doi. 10.1210/en.2007-1805.

Stark, K.; Bylund, J.; Törmä, H.; Sahlén, G. et al. On the mechanism of biosynthesis of 19hydroxyprostaglandins of human seminal fluid and expression of cyclooxygenase-2, PGH 19hydroxylase (CYP4F8) and microsomal PGE synthase-1 in seminal vesicles and vas deferens. Prostaglandins Other Lipid Mediat, ν. 75, n. 1-4, р. 47-64, 2005. doi. 10.1016/j.prostaglandins.2004.09.014.

Stutler, S. A.; Johnson, E. W.; Still, K. R.; Schaeffer, D. J. et al. Effect of method of euthanasia on sperm motility of mature Sprague-Dawley rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 46, n. 2, p. 13-20, 2007. doi.

Suarez, S. S.; Ho, H. C. Hyperactivated motility in sperm. **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 2, p. 119-24, 2003. doi. 10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x.

Suárez, S. S.; Osman, R. A. Initiation of Hyperactivated Flagellar Bending in Mouse Sperm within the Female Reproductive Tract1. **Biol Reprod**, v. 36, n. 5, p. 1191-98, 1987. doi. 10.1095/biolreprod36.5.1191.

Turner, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reprod Fertil Dev**, v. 18, n. 2, p. 25-38, 2005. doi. https://doi.org/10.1071/RD05120.

Turner, R. M.; Eriksson, R. L.; Gerton, G. L.; Moss, S. B. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, prohAKAP82 and hAKAP82. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 9, p. 816-24, 1999. doi. 10.1093/molehr/5.9.816.

Ulvsback, M.; Lazure, C.; Lilja, H.; Spurr, N. K. et al. Gene structure of semenogelin I and II. The predominant proteins in human semen are encoded by two homologous genes on chromosome 20. **J Biol Chem**, v. 267, n. 25, p. 18080-4, 1992. doi.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-79, 2002. doi. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1.

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, 1995. doi.

Visconti, P. E.; Krapf, D.; de la Vega-Beltran, J. L.; Acevedo, J. J. et al. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian J Androl**, v. 13, n. 3, p. 395-405, 2011. doi. 10.1038/aja.2010.69.

Visconti, P. E.; Westbrook, V. A.; Chertihin, O.; Demarco, I. et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **J Reprod Immunol**, v. 53, n. 1, p. 133-50, 2002. doi. https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00103-6.

Wang, J.-Y.; Hsu, M.-C.; Tseng, T.-H.; Wu, L.-S. et al. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. **J Chin Med Assoc**, v. 78, n. 4, p. 249-57, 2015. doi. 10.1016/j.jcma.2015.01.004.

Wang, Z.; Widgren, E. E.; Richardson, R. T.; O'Rand, M. G. Characterization of an Eppin Protein Complex from Human Semen and Spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 77, n. 3, p. 476-84, 2007. doi. 10.1095/biolreprod.107.060194.

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.

Welsh, M.; Moffat, L.; Jack, L.; McNeilly, A. et al. Deletion of Androgen Receptor in the Smooth Muscle of the Seminal Vesicles Impairs Secretory Function and Alters Its Responsiveness to Exogenous Testosterone and Estradiol. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3374-85, 2010. doi. 10.1210/en.2009-1339.

Xia, J.; Reigada, D.; Mitchell, C. H.; Ren, D. CATSPER channel-mediated Ca2+ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. **Biol Reprod**, v. 77, n. 3, p. 551-9, 2007. doi. 10.1095/biolreprod.107.061358.

Yoshida, K.; Kawano, N.; Yoshiike, M.; Yoshida, M. et al. Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 3, p. 151-56, 2008a. doi. 10.1093/molehr/gan003.

Yoshida, K.; Krasznai, Z. T.; Krasznai, Z.; Yoshiike, M. et al. Functional implications of membrane modification with semenogelins for inhibition of sperm motility in humans. **Cell Motil Cytoskel**, v. 66, n. 2, p. 99-108, 2009. doi.

Yoshida, K.; Yamasaki, T.; Yoshiike, M.; Takano, S. et al. Quantification of Seminal Plasma Motility Inhibitor/Semenogelin in Human Seminal Plasma. **J Androl**, v. 24, n. 6, p. 878-84, 2003. doi.

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, 2008b. doi. 10.1007/s00018-008-8230-z.