



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

Alan Andrew dos Santos Silva

**Papel da EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*) sobre a maturação
pós-testicular de espermatozoides de camundongos: consequências
para a função espermática.**

**Botucatu-SP
2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Alan Andrew dos Santos Silva

**Papel da EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*) sobre a maturação
pós-testicular de espermatozoides de camundongos: consequências
para a função espermática.**

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

Candidato: Alan Andrew dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

**Botucatu-SP
202**

S586p

Silva, Alan Andrew dos Santos

Papel da EPPIN (Epididymal protease inhibitor) sobre a maturação pós-testicular de espermatozoides de camundongos: consequências para a função espermática. / Alan Andrew dos Santos Silva. -- Botucatu, 2021

112 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Prof. Dr. Erick Jose Ramo Silva

1. Espermatozoides. 2. EPPIN. 3. Camundongos. 4. Contracepção Masculina. 5. Motilidade Espermática. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Auxílio Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(processos 2015/08227-0, 2017/20944-0 e 2019/13661-1)

“Se estás aflito por alguma coisa externa, não é ela que te perturba, mas o juízo que dela fazes. E está em teu poder dissipar esse juízo. Mas se a dor provém da tua disposição interior, quem te impede de a corrigir? E se sofres particularmente por não estares a fazer algo que te parece certo, por que não ages, em vez de te lamentares? Um obstáculo insuperável te impede? Não te aflijas, então, pois a causa de não o estares a fazer não depende de ti.”

“Quando alguém te ofende, que o teu primeiro pensamento seja este: Com base em que conceito de bem e mal é que isto foi feito? Uma vez isto sabido, o espanto e a cólera darão lugar à piedade. Porque, ou as tuas próprias ideias sobre o que é bom não são mais avançadas do que as dele, ou pelo menos têm alguma semelhança com elas, e, neste caso, é teu dever, evidentemente, perdoar-lhe; ou então, por outro lado, evoluíste para além da suposição de que tais actos são bons ou maus e, portanto, será tanto mais fácil seres tolerante em relação à cegueira de outrem.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador por cada conquista ao longo desse percurso e também pelos desafios, os quais me serviram de aprendizado. Obrigado, pois nos momentos de solidão, seu afago e conforto se fizeram presente, sempre me guiando.

Agradeço a minha mãe Nilce Maria dos Santos por sempre acreditar em mim, por sonhar com meu ingresso em uma Universidade Pública, por todo carinho e amor que tornou a minha caminhada mais leve. Ao meu pai Dirceu Maria da Silva por apoiar minhas escolhas e sempre estar do meu lado. A vocês dois, agradeço por dedicarem a vida a mim e minha irmã.

À minha irmã Aline Andressa dos Santos Silva (por ter dado a mim a dádiva de ser Tio) e meus sobrinhos Enzo Gabriel e Enrico Paruker da Silva por tornarem meus dias mais felizes, compartilharem milhares de sorrisos, abraços apertados e muito aprendizado.

Ao meu companheiro Kauan Rodrigues Alves, pelo amor, carinho, amizade e pela paciência que me proporcionou durante o período de desenvolvimento dessa dissertação. Obrigado por acreditar em meu potencial e sonhar comigo os meus sonhos.

Agradeço a todos meus familiares (avós, tios e primos), em especial agradeço a minha vó materna (Alzira Pires dos Santos), minha segunda mãe e que me ensinou a sempre ter muita coragem, dedicação e persistência para toda a vida, até mesmo no último suspiro. As minhas tias Alzira, Elza e Edileide por toda ajuda, inspiração e perseverança depositadas em mim.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Andre Muller, José Possomato Vieira da Silva, Noemia Aparecida Partelli Mariani, Tamiris Rocha Fanti Raimundo, Alexandre Dorth de Andrade, Juliana de Jesus Andrade, Natália Calixto Miranda Santos, Edileia de Souza Paula, Priscila Gasperini Camolesi de Almeida, Leonardo Rokita de Rosa, que me ajudaram ao longo da graduação e do mestrado e me proporcionaram excelentes momentos.

Agradeço aos meus amigos, João Pedro Gasparini Signoretti, Vanessa Barci, Karina Andressa Tomazini, Thais Romano Ferreira, Camila Litholdo, Victor Marques Cruz, Gustavo Cabral da Silva, Larissa Pereira Rodrigues, Giovana Pereira de Oliveira, Ana Carolina Fioretto por acrescentarem tantas alegrias aos meus dias, por ampliarem a minha felicidade, por partilharem conhecimentos e que de alguma maneira contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva por todo apoio e conhecimento que, excepcionalmente, deu-me durante toda a graduação e no mestrado, especialmente, pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação. Por ter sido tão presente na construção deste trabalho, por meio de suas sugestões e críticas, participando de forma determinante para que ele acontecesse. Seu profissionalismo é algo que inspira e faz a diferença na vida de todas as pessoas que se aproximam dele.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Christina Werneck Avellar e seus alunos Lucas Garcia Alves Ferreira e Geanne Arantes Freitas pela colaboração e aprendizado desenvolvido na UNIFESP.

Agradeço aos Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e Dra. Fernanda Fagali Franchi pela disponibilização do microscópio para análise dos experimentos de imunofluorescência, e à Profa. Dra. Roseli de Oliveira Godinho pela doação do composto forskolin.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, Prof. Dr. André Sampaio Pupo, Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior, Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Profa. Dra. Márcia Gallacci e Profa. Dra. Valeria Cristina Sandrim que contribuíram grandemente para a minha formação.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Janete Camargo, Ana Cristina Murcia de Souza, Paulo Cesar Mioni, Luís A. de Oliveira e em especial ao Prof. Dr. Hélio Kushima pela amizade, pelos ensinamentos e pelo auxílio e apoio em todos os momentos.

Agradeço a todo o suporte dado pelo Instituto de Biociências de Botucatu e pelo Departamento de Farmacologia.

Agradeço aos professores que fizeram parte da banca de qualificação e defesa de mestrado por toda contribuição ao trabalho e discussões científicas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e também pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos 2015/08227-0, 2017/20944-0 e 2019/13661-1).

RESUMO

Cerca de 40% das 215 milhões de gestações que ocorrem anualmente no planeta não são planejadas pelos casais, das quais 20% acabam em abortamentos. Este cenário reforça a necessidade do desenvolvimento de novos métodos contraceptivos, em especial os masculinos, cujas opções atuais limitam-se ao preservativo e vasectomia. A EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*) é uma proteína rica em resíduos de cisteína que contém em sua sequência primária os domínios inibidores de protease do tipo WFDC (N-terminal) e Kunitz (C-terminal). A EPPIN é encontrada na superfície do espermatozoide, onde exerce um papel fundamental essencial na função do gameta masculino. A relevância da EPPIN como alvo espermático para contracepção masculina foi demonstrada pelos efeitos inibitórios de anticorpos anti-EPPIN e de ligantes orgânicos de baixo peso molecular sobre a motilidade do espermatozoide humano e de primatas não-humanos. O desenvolvimento de fármacos contraceptivos com alto grau de eficácia e segurança baseados na EPPIN como alvo molecular requer um profundo entendimento de suas funções e mecanismos moleculares pelos quais esta proteína regula a fertilidade masculina. Visando fomentar avanços nesse sentido, investigamos o papel da EPPIN em eventos associados à motilidade e capacitação espermática, bem como impacto da maturação pós-testicular sobre a distribuição celular da EPPIN em espermatozoides de camundongos. Para determinar o efeito da maturação e capacitação espermática sobre a localização da EPPIN no espermatozoide murino, realizamos ensaios de *Western blot* e imunofluorescência. Para investigar o papel da EPPIN no controle da motilidade espermática, avaliamos o efeito de anticorpos anti-EPPIN que reconhecem epítomos nos domínios Kunitz (anticorpo S21C e F21C) e WFDC (anticorpo Q20E) sobre parâmetros de motilidade e cinemática por análise computadorizada (CASA). Detectamos uma dinâmica na presença da EPPIN na fração solúvel em Triton X-100, na fração enriquecida de membrana, e em associação com estruturas do citoesqueleto de espermatozoides epididimários, sugerindo uma associação entre o grau de maturação espermática e a distribuição celular da EPPIN. Observamos que o anticorpo S21C, mas não o F21C, inibiu a motilidade espermática progressiva e hiperativada. Em suporte a estes achados, o anticorpo S21C alterou os parâmetros de cinemática que descrevem a progressividade (VSL, VAP e STR) e o vigor (VCL, ALH e LIN) do movimento espermático. Interessantemente, o fragmento S21C Fab reproduziu efeitos similares ao total, indicando que a ligação monovalente ao epítopo S21C é suficiente para afetar a motilidade e hiperativação espermática. Por sua vez, o anticorpo Q20E (inteiro e fragmento Fab) inibiu a motilidade progressiva e os parâmetros de cinemática (VAP, VCL, ALH) de forma menos intensa em comparação ao anticorpo S21C. Visando investigar o mecanismo de ação associado aos efeitos dos anticorpos anti-EPPIN sobre a motilidade progressiva e hiperativada, avaliamos a fosforilação da proteína quinase A (PKA) e a produção de adenosina 3'-5'- monofosfato cíclico (AMPc) associados à capacitação por *Western blot* e AlphaScreen. Nossos resultados demonstraram que o anticorpo S21C induziu aumento na PKA total/PKA fosforilada, sem alterar e os níveis intracelulares de AMPc. Em conclusão, o domínio Kunitz da EPPIN desempenha papel essencial na regulação da motilidade espermática e hiperativação, e seu domínio WFDC pode contribuir para com estes efeitos. A presença da EPPIN em estruturas associadas ao citoesqueleto celular reforça o seu envolvimento em eventos associados à motilidade espermática. Os achados deste estudo contribuem para o desenvolvimento da EPPIN como alvo farmacológico para contracepção masculina.

ABSTRACT

Around 40% of pregnancies globally are unintended; among them, 20% are terminated in abortion. This scenario reinforces the need for new contraception methods, especially male options, which are currently limited to condoms and vasectomy. EPPIN (Epididymal protease inhibitor) is a cysteine-rich protein containing both WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) protease inhibitor consensus sequences. EPPIN is present on the surface of spermatozoa, where it plays a critical role in sperm function. The suitability for male contraceptive pharmacological interventions targeting EPPIN was demonstrated by the inhibitory effects of anti-EPPIN antibodies and small molecular ligands on sperm motility in human and non-human primate models. Developing effective and safe contraceptive drugs targeting EPPIN functions requires a deeper understanding of its physiological roles and mechanisms regulating male fertility. Here, we investigated the role of EPPIN in events associated with sperm motility and capacitation and the impact of post-testicular maturation on the relative stability of EPPIN in mouse spermatozoa. We evaluated whether epididymal transit and capacitation modulate EPPIN distribution and localization in mouse spermatozoa by Western blot and immunofluorescence assays. We evaluated the effects of antibodies anti-EPPIN (IgG and Fab fragments) mapping sequences in EPPIN WFDC (Q20E antibody) and Kunitz (S21C and F21C antibody) domains on mouse sperm motility and kinematic parameters by computer-assisted sperm analysis (CASA). We detected the presence of EPPIN in different protein fractions of mouse spermatozoa: (i) soluble fraction, (ii) membrane-enriched fraction, and (iii) in association with sperm cytoskeleton and flagellar accessory structures. The presence of EPPIN associated with membrane and cytoskeleton structures reinforces its involvement in events related to mouse sperm motility. Moreover, epididymal sperm maturation, but not capacitation, was associated with changes in the presence of EPPIN in association with sperm cytoskeleton and flagellar accessory structures. We showed that the S21C antibody, but not the F21C, inhibited progressive and hyperactivated sperm motility. In addition, the S21C antibody affected the kinematics parameters that describe the progressivity (VSL, VAP, STR) and vigor (VCL, ALH, LIN) of the sperm movement. Interestingly, S21C Fab fragments reproduced these outcomes, indicating that monovalent binding to the S21C epitope is sufficient to affect sperm motility and hyperactivation. Conversely, the Q20E antibody (whole IgG and Fab fragment) induced a milder effect on inhibition of progressive motility and kinematic parameters (VAP, VCL, ALH). To provide insights into the underlying mechanisms by which anti-EPPIN antibodies impair sperm motility parameters, we evaluated their effects on sperm capacitation-induced phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the production of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate (cAMP) by Western blot and AlphaScreen, respectively. Our results suggest that the S21C antibody induced an increase in PKA/phospho-PKA ratio without changing the intracellular levels of cAMP. In conclusion, our results demonstrate the key roles of EPPIN C-terminal (Kunitz domain) sequences on the regulation of mouse sperm motility and hyperactivation and that its WFDC domain also contributes to these outcomes. Our findings contribute to the development of EPPIN as a sperm drug target for non-hormonal male contraception.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

11- β -MNTDC: 11-beta-metil-19-nortestosterona-17-beta-dodecil carbonato

ACs/ADCY10: adenilil ciclase solúvel

AMPc: adenosina 3'-5'- monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

BRDT: proteína bromodomínio específica do testículo

BSA: albumina de soro bovina

CA: anidrase carbonica

CatSper: canal de cátions dos espermatozoides

CFTR: regulador de condutância de membrana na fibrose cística

CRISP: proteína secretada rica em cisteínas

DHT: di-hidrotestosterona

DMA: dimetandrolona

DMAU: undecanoato de dimetandrolona

DPBS: solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco)

DTT: ditionitrito

EPPIN: inibidor de protease epididimário

ET: enantato de testosterona

FDE: fosfodiesterase

FSH: hormônio folículo estimulante

GAPDS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase espermática

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

GSK3: glicogênio sintase quinase 3

HBSS: Solução Balanceada de HANK'S

HHG: hipotálamo-hipófise-gonadal

Hv1: canal de hidrogênio dependente de voltagem

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IgG: imunoglobulina G

IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato

LH: hormônio luteinizante

NBC: cotransportador de sódio e bicarbonato

NES: nestorona

PBS: tampão fosfato-salino

PKA: proteína quinase A

PPP1: fosfoproteína fosfatase 1

PSA: antígeno prostático específico

SACH: isômero (S) α -cloridrina

SEMG1: semenogelina 1

SLC: cotransportador de cloro e bicarbonato

SLC: transportador carregador de soluto

sNHE: trocador de Na^+/H^+

SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês

TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

TRPV4: canal de voltagem regulado por temperatura

UT: undecanoato de testosterona

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

ZP3: zona pellucida glycoprotein 3, do inglês

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Estratégias hormonais para contracepção masculina	12
1.2. Estratégias não-hormonais para contracepção masculina	15
2. Espermatozoide	18
2.1. Maturação espermática.....	21
2.2. Capacitação espermática.....	23
2.2.1. <i>Vias de sinalização associadas à capacitação espermática</i>	24
2.2.2. <i>Eventos funcionais associados a capacitação espermática</i>	31
3. Proteínas espermáticas como alvo para contracepção masculina.....	33
4. EPPIN	36
OBJETIVOS	41
1. Objetivo geral	41
2. Objetivos específicos.....	41
Capítulo 2.....	41
Differential effects of antibodies mapping EPPIN N-terminal and C-terminal sequences on the regulation of mouse sperm motility	42
ABSTRACT	42
INTRODUCTION.....	43
RESULTS.....	44
EPPIN is differentially associated with sperm surface and cytoskeleton structures during post-testicular maturation.....	44
Antibodies mapping epitopes in EPPIN WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) domains differentially inhibited mouse sperm motility	47
Antibodies mapping epitopes in EPPIN WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) domains differentially modulated mouse sperm kinematics parameters	50
DISCUSSION.....	55
MATERIALS AND METHODS.....	58
Reagents and chemicals.....	58
Animals.....	58
Anti-EPPIN antibodies	59
Preparation of sperm soluble and insoluble protein fractions	60
Cell fractionation	60
Western blot analysis.....	61
Immunofluorescence.....	61
Analysis of Sperm Motility	61
Statistical Analysis	62

REFERENCES.....	65
SUPPLEMENTARY MATERIAL	69
Capítulo 3.....	77
Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E (IgG inteiro e fragmentos Fab) sobre vias de sinalização associadas à capacitação espermática.....	78
Materiais e métodos	78
Análise temporal da relação PKA total/PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides murinos submetidos à capacitação	78
Determinação dos níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides murinos submetidos à capacitação	80
Análise estatística	80
Resultados e Discussão	81
Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E (Fragmento Fab) sobre a relação PKA total/PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides murinos submetidos à capacitação...	81
Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E sobre a determinação dos níveis intracelulares de AMPc	83
Capítulo 4.....	87
CONCLUSÃO	88
Referências bibliográficas dos capítulos 1 e 3.....	89
ANEXO I	105
ANEXO II.....	106
ANEXO III.....	107
ANEXO IV	108

Capítulo 1

1. Introdução

Vivemos um momento extraordinário – o planeta terra está, neste exato momento, experimentando um incrível aumento populacional da humanidade. Estudos indicam que a atual população mundial de 7,5 bilhões de habitantes deverá aumentar para quase 10 bilhões em 2050) (MATHEW & BANTWAL, 2012; NYA-NGATCHOU & AMORY, 2013). Sendo assim, a população vem aumentando em aproximadamente 180.000 mil pessoas a cada 24 horas.

Parte desse crescimento populacional alarmante vem ocorrendo de forma descontrolada. De fato, das 215 milhões gestações que ocorrem anualmente em todo planeta, ~40% não são planejadas pelos casais, dentre as quais 20% são interrompidas por procedimentos de aborto (CHAMBERLAIN *et al.*, 2020). Estudos indicam que essa alta taxa de gestações não-planejadas está fortemente associada a impactos negativos sobre a saúde física e mental das mulheres e seus filhos, sobre os serviços de saúde pública, bem como em aspectos econômicos e sociais (SEDGH *et al.*, 2014). Diante deste cenário, ações visando a pesquisa de novos contraceptivos, a melhoria do acesso a anticoncepcionais e a educação acerca dos contraceptivos existentes são fundamentais para a promoção do planejamento familiar e redução da alta taxa de gestações não planejadas (ARIFUZZAMAN *et al.*, 2019). Em especial, a entrada de novos contraceptivos masculinos no mercado ampliará significativamente as opções contraceptivas para os homens, cujas opções atuais limitam-se ao preservativo e a vasectomia.

O desenvolvimento de novas tecnologias contraceptivas masculinas que sejam reversíveis e eficazes pode proporcionar uma maior igualdade entre homens e mulheres no planejamento familiar (LONG *et al.*, 2019). Neste contexto, múltiplas estratégias farmacológicas hormonais e não-hormonais, que promovem o bloqueio reversível da fertilidade, estão em fase de desenvolvimento pré-clínico ou clínico, objetivando a entrada no mercado de novos métodos confiáveis e seguros para contracepção masculina.

1.1 Estratégias hormonais para contracepção masculina

Ensaios clínicos realizados em meados de 1970 demonstraram que a administração de testosterona como abordagem contraceptiva hormonal masculina resultou na redução das concentrações de espermatozoides no sêmen (WANG *et al.*, 2016). Desde então, diversos

estudos vêm sendo conduzidos para o desenvolvimento e/ou aprimoramento de métodos contraceptivos masculinos hormonais (LONG *et al.*, 2019). Mas como os contraceptivos masculinos hormonais funcionam?

O fundamento farmacológico do uso de androgênios como contraceptivos masculinos hormonais se dá pelos seus efeitos inibitórios sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Em homens, o HHG funciona em um ciclo clássico de retroalimentação negativa. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido por neurônios hipotalâmicos, estimula a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela glândula pituitária anterior. O FSH e o LH atuam nos testículos estimulando as células de Sertoli e de Leydig, respectivamente, estimulando a produção de testosterona e a espermatogênese (COMNINOS *et al.* 2014). A testosterona e seu metabólito ativo di-hidrotestosterona (DHT) promovem seus efeitos androgênico-anabólicos pela interação com os receptores de androgênios. Em particular, as altas concentrações testiculares de androgênios são fundamentais para a promoção da espermatogênese (DOHLE *et al.*, 2003). Além disso, esses hormônios se ligam aos receptores de androgênios presentes no hipotálamo e pituitária, inibindo a liberação de GnRH e gonadotrofinas, fechando desta maneira o ciclo de retroalimentação do eixo HHG.

O efeito contraceptivo masculino de androgênios exógenos se dá pela inibição crônica do eixo HHG consequentemente reduzindo a esteroidogênese gonadal. Similar à testosterona endógena, os androgênios exógenos se ligam aos receptores de androgênios periféricos, mantendo desta maneira a ação androgênico-anabólica nos diversos tecidos, tais como: músculo esquelético, fígado, pele, próstata, dentre outros órgãos-alvos desses hormônios. No entanto, a supressão da produção de GnRH, FSH, e LH por esses fármacos resulta na inibição da síntese intratesticular de testosterona e, consequentemente da espermatogênese (COVIELLO *et al.*, 2004)

Estudos iniciais demonstraram que androgênios injetáveis, como os ésteres de testosterona enantato de testosterona (ET) ou undecanoato de testosterona (UT) promoveram inibição robusta da contagem espermática na maior parte dos voluntários a valores que induzem infertilidade (< 1 milhão/mL) (GU *et al.*, 2004; MOMMERS *et al.*, 2008). No entanto, variações na proporção de homens que responderam adequadamente ao tratamento, a limitação da adesão

à terapia em decorrência da via de administração parenteral (intramuscular), bem como os efeitos adversos observados limitaram a aplicação desses fármacos como contraceptivos masculinos (GU *et al.*, 2004; QOUBAITARY *et al.*, 2006). Visando suplantar essas limitações, estudos adicionais demonstraram que a associação de uma progestina aos androgênios aumenta a retroalimentação central sobre o eixo HHG, inibindo mais rapidamente e consistentemente a produção de gonadotrofinas e a função endócrina testicular (LIU *et al.*, 2008; LUE *et al.*, 2013).

De fato, candidatos promissores para estratégias hormonais de contracepção masculina são fármacos com atividade androgênica e progestágena, tais como: undecanoato de dimetandrolona (DMAU) e o 11-beta-metil-19-nortestosterona-17-beta-dodecil carbonato (11- β -MNTDC) (ATTARDI *et al.*, 2011, 2006). Quando administrado por via oral ou intramuscular, o DMAU é hidrolisado à sua forma ativa, a dimetandrolona, um derivado da 19-nortestosteona com atividade agonista em receptores de androgênios e de progesterona (SUVISAARI *et al.*, 1997). Em um tratamento diário com doses de 200 mg a 400 mg por via oral de DMAU durante 28 dias em homens, observou-se a redução aos níveis basais de gonadotrofinas circulantes, sem efeitos adversos aparentes (NGUYEN *et al.*, 2020; THIRUMALAI & PAGE, 2019). Já a “pílula-irmã” do DMAU, o 11- β -MNTDC, apresentou efeitos similares nas diferentes doses (200, 400 ou 800 mg) administradas por via oral, uma vez ao dia, durante 28 dias de tratamento (NGUYEN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2019). A avaliação em longo prazo desses fármacos androgênico-progestágenos é essencial para garantir a sua segurança e eficácia e se podem efetivamente afetar a produção espermática.

Outro método em desenvolvimento inclui a aplicação diária de um gel contendo testosterona e nestorona (NES), uma progestina sintética. A utilização do gel testosterona/NES (100 mg, 8 mg) reduziu a concentração de espermatozoides para <1 milhão/mL, resultando em oligospermia ou azoospermia em aproximadamente 90% dos homens quando comparado com apenas 23% daqueles que utilizaram apenas gel com testosterona ou placebo (ILANI *et al.*, 2012).

Embora as preparações hormonais à base de derivados de hormônios esteroides (androgênios e progestágenos) tenham reconhecida capacidade de induzir uma redução significativa da contagem espermática pela inibição da espermatogênese, elas possuem diversas desvantagens, incluindo longo período de latência terapêutica (de 3 a 6 meses), variações na

efetividade contraceptiva de acordo com a população de estudo, via de administração parenteral para a maioria das preparações testadas e efeitos adversos (ganho de peso, acne, alterações de humor, etc.), as quais dificultam seu desenvolvimento clínico (THIRUMALAI & PAGE, 2019).

Esses obstáculos têm levado à busca por alvos farmacológicos não-hormonais para contracepção masculina, abordagem que apresenta maior potencial para induzir o efeito desejado de forma rápida e sem os efeitos adversos característicos de manipulações dos níveis plasmáticos de hormônios do eixo HHG (PAYNE & GOLDBERG, 2014).

1.2. Estratégias não-hormonais para contracepção masculina

O perfil de um alvo farmacológico para o desenvolvimento de contraceptivos masculinos não-hormonais inclui (i) expressão específica ou seletiva no trato reprodutor masculino; (ii) papel essencial na fertilidade, de forma que seu bloqueio induza infertilidade; e (iii) susceptibilidade de manipulação farmacológica (KOPF, 2008). Nesse contexto, as estratégias atuais para contracepção masculina não-hormonal visam prevenir reversivelmente a fertilidade pela inibição ou bloqueio de processos essenciais associados à história natural do espermatozoide, incluindo sua produção (alvos testiculares), maturação, transporte e armazenamento (alvos epididimários) e eventos pós-ejaculatórios diretamente associados ao seu potencial fértil (alvos espermáticos) (LONG *et al.*, 2019; REYNOLDS-WRIGHT & ANDERSON, 2019). Avanços recentes nas metodologias “ômicas” (p. ex., genômica, transcriptômica e proteômica) resultaram na expansão do número de proteínas específicas do testículo, epidídimo ou espermatozoide, as quais podem se encaixar no perfil de um alvo farmacológico para contracepção masculina (DREVET, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2021).

Os testículos apresentam duas funções principais: endócrina, sendo o principal responsável pela produção dos androgênios; e reprodutiva, sendo o local da espermatogênese. Estratégias testiculares para contracepção masculina não-hormonal baseadas no testículo visam a inibição da produção espermática, sem interferir na esteroidogênese gonadal (KOPF, 2008). Dessa forma, buscam-se alvos moleculares com funções essenciais em etapas chaves da espermatogênese, espermiogênese ou espermiação, cujo bloqueio culmina na redução da produção diária de espermatozoides e, conseqüentemente, indução oligospermia ou

azoospermia (THIRUMALAI & PAGE, 2019). Nesse contexto, proteínas presentes nas células germinativas (em especial espermatócitos, espermátides redondas e espermátides alongadas) e nas células de Sertoli que regulam eventos meióticos e pós-meióticos da espermatogênese emergem como alvos potenciais para uma intervenção segura e reversível (ARIFUZZAMAN *et al.*, 2019; DJUREINOVIC *et al.*, 2014). Um exemplo é a proteína bromodomínio específica do testículo (do inglês *Bromodomain testis-specific protein*; BRDT), que possui expressão específica em espermatócitos paquítenos e diplótenos e em espermátides redondas, onde atua no remodelamento da cromatina durante etapas pós-meióticas da espermatogênese (SHANG *et al.*, 2007). A administração do composto experimental JQ1, um inibidor seletivo da BRDT, promoveu infertilidade em camundongos via inibição seletiva da produção de espermátides, sem afetar a população de espermatogônias (MATZUK *et al.*, 2012). A suspensão do tratamento resultou no reestabelecimento da produção espermática e, conseqüentemente, da fertilidade. Apesar desses resultados promissores, as abordagens testiculares ainda esbarram em algumas limitações importantes, incluindo o longo período de latência, reversibilidade lenta e dificuldades inerentes à capacidade de xenobióticos atravessarem a barreira hemato-testicular (KOPF, 2008). Essas barreiras podem ser suplantadas por estratégias focadas em eventos de maturação pós-testicular.

O epidídimo emerge como uma fonte promissora de alvos farmacológicos para abordagens contraceptivas masculinas pós-testiculares (KOPF, 2008; SIPILÄ *et al.*, 2009). Trata-se de um único ducto, altamente enovelado, composto por um epitélio pseudoestratificado que forma a luz tubular, onde estão localizados os espermatozoides, envolto por uma camada de músculo liso (ROBAIRE & HINTON, 2015). A relevância do epidídimo para a fertilidade masculina se baseia na sua capacidade de fornecer o ambiente adequado para maturação, transporte, armazenamento e proteção dos espermatozoides até o momento da ejaculação.

O racional de uma abordagem epididimária para contracepção masculina envolve interferir em etapas fundamentais para os processos de maturação, transporte ou armazenamento dos espermatozoides, induzindo oligospermia, azoospermia ou alterações espermáticas, como imobilidade ou incapacidade de passar pelo processo de capacitação (SIPILÄ *et al.*, 2009). Dessa forma, alvos epididimários para contracepção masculina apresentam a vantagem de não

interferirem na produção dos espermatozoides, o que resulta em tempos de latência e de reversibilidade reduzidos. Além disso, o perfil de segurança também é favorável, pois se reduz o risco de alterações cromossômicas nas células germinativas (DREVET, 2018).

De fato, a combinação de ferramentas de proteômica e de edição gênica resultou na identificação de um conjunto de genes com expressão seletiva ou específica no epidídimo e funções essenciais na maturação espermática, os quais vêm sendo considerados alvos promissores para a contracepção masculina (DREVET, 2018; ROBERTSON *et al.*, 2020; SIPILÄ *et al.*, 2009). Um exemplo é a calcineurina, uma serino-fosfatase que possui uma isoforma específica do espermatozoide (MIYATA *et al.*, 2015). A calcineurina é composta por uma subunidade catalítica (C) e outra reguladora (R) (MURAMATSU *et al.*, 1992). Em mamíferos foram identificadas três isoformas da subunidade C (PPP3CA, PPP3CB e PPP3CC) e duas isoformas da subunidade R (PPP3R1 e PPP3R2) (MURUMATSU *et al.*, 1992). As subunidades PPP3CC e PPP3R2 apresentaram expressão específica no flagelo do espermatozoide humano e murino, formando a composição da calcineurina no gameta masculino (MIYATA *et al.*, 2015). Estudos de deleção gênica para *Ppp3cc* e *Ppp3r2* resultaram em camundongos inférteis, em decorrência de aberrações na motilidade espermática (MIYATA *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2001). Adicionalmente, o tratamento de camundongos selvagens com os inibidores da calcineurina ciclosporina A (80 mg/kg) e FK506 (8 mg/kg) por via subcutânea durante 14 dias resultou em infertilidade via efeitos deletérios sobre a maturação espermática no epidídimo, os quais impediram a hiperativação dos espermatozoides após a ejaculação (MIYATA *et al.*, 2015). A fertilidade foi recuperada com a suspensão do tratamento com os inibidores da calcineurina (MIYATA *et al.*, 2015). A inibição do complexo espermático específico da calcineurina, tendo como alvo o espermatozoide epididimário, abre espaço para o desenvolvimento de novas drogas contraceptivas masculinas com potencial para induzir o efeito desejado de forma rápida e sem os efeitos adversos característicos. Porém, mais estudos serão necessários para obtenção da dosagem ideal e detecção dos possíveis riscos e efeitos colaterais do uso destes inibidores.

Durante sua jornada pelo epidídimo, o espermatozoide passa por mudanças importantes no seu perfil proteômico, o que acarreta na aquisição ou perda de proteínas, alterações nas redes de interação proteína-proteína e modificações pós-traducionais de proteínas espermáticas

(GERVASI & VISCONTI, 2017). Nesse contexto, diversas proteínas espermáticas, incluindo proteínas transmembranares (p.ex., canais iônicos e transportadores) e intracelulares (p. ex., elementos das estruturas flagelares e enzimas) podem ter papéis no controle das funções associadas ao espermatozoide maduro, incluindo motilidade, hiperativação e fertilização do oócito. Esta diversidade de alvos moleculares espermáticos abre espaço para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para contracepção masculina cujo objetivo é tornar o espermatozoide ejaculado em uma célula incapaz de cumprir sua função (DARSZON *et al.*, 2011; KLENTZERIS *et al.*, 1995; REDDY *et al.*, 1998; SIPILÄ & BJÖRKGREN, 2016).

Deste modo, interferir na função do espermatozoide maduro emerge como uma estratégia com potencial para inibição seletiva, reversível, rápida e segura da fertilidade masculina. Considerando o espermatozoide como o foco do nosso estudo, abordamos a seguir seus aspectos estruturais e fisiológicos básicos, visando o melhor entendimento das estratégias contraceptivas masculinas focadas no gameta masculino.

2. Espermatozoide

A espermiogênese, fase final da espermatogênese, refere-se ao processo de transformação morfológica no qual espermátides redondas haploides passam pelo processo sequencial de diferenciação celular gerando espermátides alongadas, que por sua vez se diferenciam em espermatozoides altamente especializados, cuja função é transportar e entregar o genoma masculino ao oócito no momento da fertilização (EDDY, 2006; FREITAS *et al.*, 2017). Dessa forma, o espermatozoide é a única célula do organismo humano cuja função é realizada em outro indivíduo (FREITAS *et al.*, 2017).

Os dois principais componentes da estrutura morfológica do espermatozoide são a cabeça e o flagelo, separados pela peça de conexão (Figura 1A). Na cabeça do espermatozoide encontram-se o núcleo altamente condensado, o acrossoma e estruturas remanescentes do citoplasma (EDDY, 2006). Ela pode ser dividida em acrossoma, segmento equatorial e região pós-acrossômica. O tamanho e morfologia cabeça do espermatozoide variam conforme a espécie, sendo espatular no espermatozoide humano e falciforme, no murino (Figura 1B) (KRETZER *et al.*, 2016).

O flagelo é dividido em peça intermediária, principal e final (Figura 1A) (EDDY, 2006). O flagelo possui o axonema em toda sua dimensão, o qual é formado por um par central de microtúbulos cercado por nove pares adicionais (sistema “9+2”), sendo a estrutura responsável pelo movimento espermático (FREITAS *et al.*, 2017). Os nove pares de microtúbulos se conectam entre si e com o par central via nexinas e espículas radiais, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2017). O axonema também possui braços de dineínas, que são ATPases que se projetam dos pares de microtúbulos com função essencial no movimento flagelar. Na presença de adenosina trifosfato (ATP), as dineínas se deslocam em direção à base do flagelo, forçando o par de microtúbulos adjacentes a se mover na direção oposta (FREITAS *et al.*, 2017). Esse movimento encontra resistência, pois os microtúbulos estão ligados à peça de conexão, o que acarreta na “onda” do movimento flagelar (FREITAS *et al.*, 2017).

Outras estruturas que compõem o flagelo do espermatozoide de mamíferos incluem: (i) fibras densas externas, que se estendem pelas peças intermediária e principal; (ii) bainha mitocondrial, que envolve as fibras densas externas apenas na peça intermediária; e (iii) bainha fibrosa, que circunda as fibras densas externas apenas na peça principal (EDDY, 2006). De forma semelhante à cabeça, o flagelo também possui uma pequena quantidade de citoplasma, remanescente do processo de espermiogênese (EDDY, 2006).

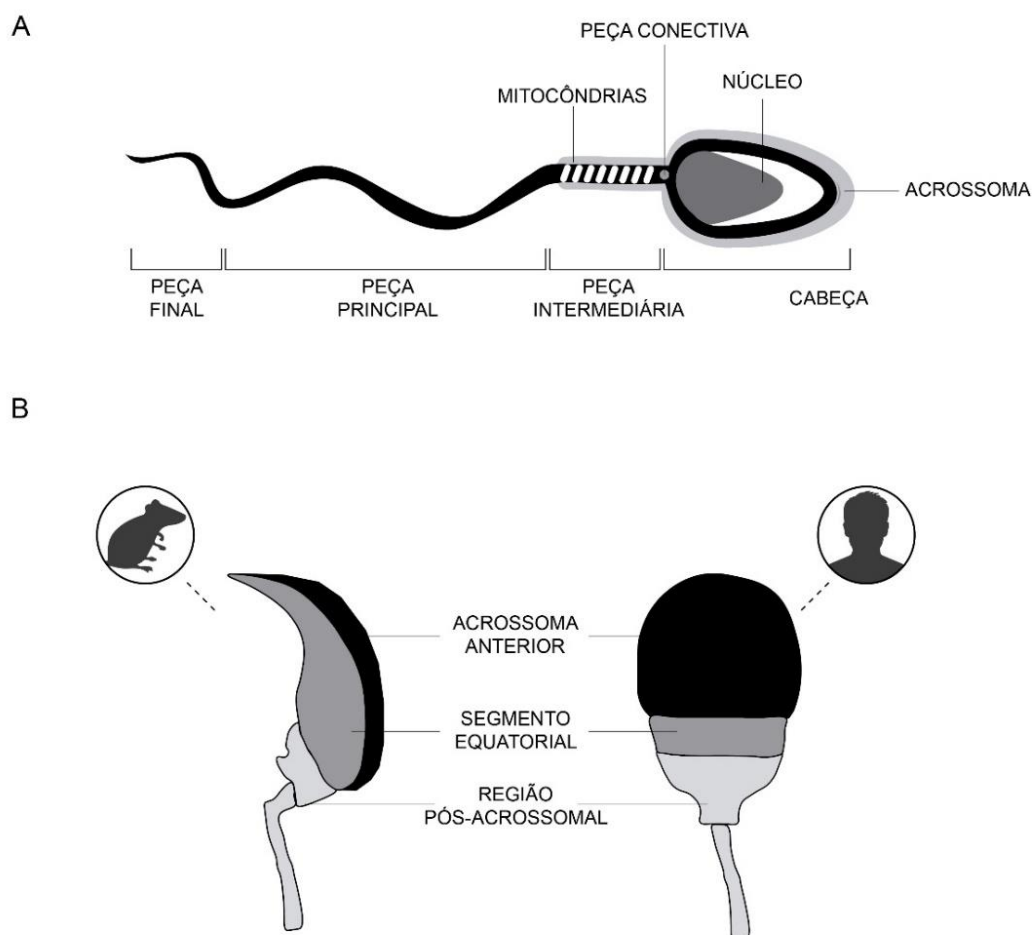


Figura 1. Aspectos morfológicos e estruturais do espermatozoide humano e murino. (A) O espermatozoide pode ser dividido em cabeça e flagelo, que são unidos pela peça de conexão. A cabeça possui o núcleo e acrossoma, enquanto o flagelo é dividido em: peça intermediária, peça principal e peça final. **(B)** A cabeça do espermatozoide pode ser dividida em acrossoma anterior, segmento equatorial e região pós-acrossomal. A região pós-acrossomal é a porção na qual a cabeça do espermatozoide não é coberta pelo acrossoma. A morfologia da cabeça do espermatozoide pode ser classificada em falciforme, como no espermatozoide de camundongos, ratos e outros roedores, e espatular, como no espermatozoide de humanos, primatas não-humanos e bovinos. Adaptado de (EDDY, 2006)

Ao deixar o testículo, o espermatozoide é morfologicamente diferenciado, mas ainda incapaz de se mover progressivamente e de fertilizar o ócito (EDDY, 2006). Essas habilidades são adquiridas durante dois processos pós-testiculares de maturação: o primeiro que ocorre durante o trânsito espermático pelo epidídimo, conhecido como maturação espermática, e o segundo, no trato reprodutor feminino, chamado de capacitação espermática (GERVASI & VISCONTI, 2017). A maturação e capacitação espermática são processos independentes, porém, sequenciais e intimamente correlacionados, cujas alterações estão associadas à infertilidade masculina (GERVASI & VISCONTI, 2017).

2.1. Maturação espermática

Os espermatozoides testiculares são células imaturas e só adquirem a capacidade de se mover progressivamente durante sua passagem pelo epidídimo. O epidídimo é um órgão que está localizado no escroto, aplicado à margem posterior do testículo conectando diretamente os ductos eferentes ao ducto deferente. Durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal ocorre um considerável alongamento deste órgão que alcança na fase adulta até um e seis metros de comprimento no homem e camundongo, respectivamente (HINTON & ROBAIRE, 2015).

Classicamente, o epidídimo está dividido em diferentes regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Com o avanço dos estudos de expressão gênica e da anatomia do epidídimo, o epidídimo está subdividido em segmentos, por exemplo, camundongos e ratos possuem 10 e 19 segmentos, respectivamente (JELINSKY *et al.*, 2007; TURNER, 2008). Comparando as regiões com os segmentos do rato: a região do “segmento inicial” corresponde aos segmentos 1-4, a cauda aos segmentos 5-11, o corpo aos segmentos 12-13 e a cauda aos segmentos 14-19. Cada segmento reporta seu próprio repertório de genes que são exclusivos para cada segmento. Estas regiões epididimárias apresentam expressão gênica diferenciada e mantém composições distintas de proteínas, íons e outros componentes do conteúdo luminal, as quais são fundamentais para a maturação, proteção e armazenamento dos espermatozoides em estado quiescente até a ejaculação (JOHNSTON *et al.*, 2005; JELINSKY *et al.*, 2007; GERVASI & VISCONTI, 2017).

Durante o período pós-natal o epitélio epididimário se diferencia em uma variedade de células, dentre elas: células principais e basais (presente em todas regiões epididimárias, células *narrow* e apicais (restritas ao segmento inicial), células clara (presente na cabeça, corpo e cauda do epidídimo), além de células como a halo e dendríticas, de origem imunológica, cuja distribuição varia ao longo do órgão (HINTON & ROBAIRE, 2015). Esse perfil de distribuição diferencial das células entre as diferentes regiões do epidídimo em conjunto com o perfil segmentado de expressão gênica confere grande complexidade fisiológica e estrutural a este órgão (CORNWALL, 2009; DA SILVA *et al.*, 2011; HINTON & ROBAIRE, 2015).

As alterações funcionais que ocorrem no espermatozoide durante seu trânsito pelo epidídimo estão associadas a modificações em sua compactação nuclear, fluidez e composição da membrana plasmática, estruturas do citoesqueleto e no perfil de proteínas, açúcares e lipídios (CORNWALL, 2009; GERVASI & VISCONTI, 2017). Considerando que o espermatozoide é uma célula transcritionalmente e traducionalmente silenciosa, a regulação da maturação epididimária é controlada, dentre outros mecanismos, pela adição ou remoção de proteínas espermáticas e modificações pós-traducionais de proteínas espermáticas, que causam a mudanças nas suas respectivas atividades biológicas e perfil de interação com outras moléculas (CABALLERO *et al.*, 2012; KOCH *et al.*, 2015). Estudos recentes demonstraram que uma parcela significativa das proteínas espermáticas é transferida do epitélio epididimário para o espermatozoide via epididimossomos (MARTIN-DELEON, 2015; SULLIVAN *et al.*, 2007). Os epididimossomos são pequenas vesículas membranosas de diferentes tamanhos e com quantidades diversificadas de proteínas, o que pode explicar a diferença na distribuição de proteínas pela membrana plasmática do espermatozoide durante sua passagem pelo epidídimo (KIRCHHOFF, 1996; BELLEANNÉE *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares pelos quais a maturação espermática confere ao espermatozoide a capacidade de se locomover ainda permanecem obscuros. No entanto, sabe-se que modificações pós-traducionais de proteínas espermáticas participam desse processo; dentre elas a (des)fosforilação em resíduos de tirosina e serina/treonina (FREITAS *et al.*, 2017; GERVASI & VISCONTI, 2017). Por exemplo, em espermatozoides imaturos, isolados da cabeça do epidídimo, a atividade da enzima fosfoproteína fosfatase 1 (PPP1), uma serina/treonina fosfatase presente na cabeça e flagelo do espermatozoide humano e murino (FARDILHA *et al.*, 2011), está aumentada, o que mantém seus substratos desfosforilados (FREITAS *et al.*, 2017). A atividade enzimática da PPP1 é regulada pelo glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), cuja atividade é maior na cabeça do epidídimo do que na região da cauda e inversamente associada à motilidade espermática (SMITH *et al.*, 1996; SOMANATH *et al.*, 2004). No espermatozoide maduro, isolado da cauda do epidídimo, processos associados ao aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} e ativação da via adenilil ciclase solúvel (ACs), também conhecida como ADCY10/ monofosfato cíclico de adenosina (AMPC)/proteína quinase A (PKA) acarretam na

redução da atividade da GSK3, com consequente inibição da PPP1, o que favorece a aquisição de motilidade progressiva (FREITAS *et al.*, 2017).

Durante a maturação epididimária, além da aquisição da motilidade progressiva, o espermatozoide desenvolve a capacidade de sofrer reação acrossômica e de reconhecer se ligar à zona pelúcida durante a fertilização (HARAYAMA *et al.*, 1993; MOORE *et al.*, 1983). Embora essencial para a reprodução, a maturação espermática ainda não produz um espermatozoide no apogeu da sua funcionalidade. Para isto, é necessária uma etapa adicional de maturação pós-testicular, que ocorre no sistema genital feminino: a capacitação.

2.2. Capacitação espermática

A capacitação espermática é definida como uma constelação de eventos moleculares, bioquímicos e funcionais que ocorrem no trato reprodutor feminino permitindo ao espermatozoide a aquisição da capacidade fértil (SUAREZ, 2008). O termo capacitação foi cunhado por Austin em 1952 e baseou-se em estudos independentes conduzidos por ele próprio e por Chang no ano anterior, nos quais eles demonstraram que os espermatozoides de mamíferos precisam permanecer um determinado tempo no sistema reprodutor feminino antes de alcançarem sua capacidade de fertilização (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). A descoberta deste fenômeno foi extremamente importante para o início dos ensaios de fertilização *in vitro*, bem como para as áreas da embriologia e biologia reprodutiva (CHRONOPOULOU & HARPER, 2015; JOHNSON, 2011). De fato, ao contrário da maturação espermática, a capacitação pode ser mimetizada *in vitro*, em meios quimicamente definidos contendo o íon carbonato (HCO_3^-), aceptores de colesterol (p.ex., albumina de soro bovino), além de outros eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , e PO_4^-) e substratos energéticos (açúcar, piruvato e lactato) (PUGA MOLINA *et al.*, 2018). Trata-se de um processo essencial para a fertilidade, que está associado à ativação de vias de sinalização celular e alterações em aspectos funcionais no espermatozoide, incluindo preparação para exocitose acrossomal, mudanças no perfil de motilidade progressiva para hiperativada e aquisição da capacidade de se fundir e fertilizar o oócito (SUAREZ, 2008).

2.2.1. Vias de sinalização associadas à capacitação espermática

Em nível molecular, a capacitação espermática está associada com diversos eventos, incluindo remoção do colesterol da membrana plasmática, aumento da fluidez da membrana, (VISCONTI *et al.*, 2011), hiperpolarização do potencial de membrana (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2006) aumento dos níveis de cálcio livre ($[Ca^{2+}]_i$) e alcalinização do pH intracelular (pHi) (DARSZON *et al.*, 2006). As mudanças no $[Ca^{2+}]_i$ e pHi promovem, dentre outros efeitos, ativação da enzima ACs, com consequente produção do segundo mensageiro AMPc e ativação da PKA, a qual promove a ativação de outras quinases (tirosinas quinases e serina/treonina quinases), que atuam na fosforilação em cascata das proteínas espermáticas (DARSZON *et al.*, 2006; KRAPF *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2017). A extensa fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, serina e treonina (incluindo a própria PKA) é considerada um marcador molecular da capacitação espermática (VISCONTI *et al.*, 1995a, 1995b).

Um dos primeiros eventos responsáveis pelo disparo da capacitação espermática envolve a remoção do colesterol da membrana plasmática espermática por aceptores de colesterol como a albumina, presente em alta concentração no fluído do oviduto (Figura 2) (OKAMURA & SUGITA, 1983). O efluxo de colesterol promove aumento na fluidez da membrana e facilita alterações estruturais que modificam a funcionalidade de proteínas transmembranares, tais como os canais iônicos Hv1 (permeável a prótons), CatSper (permeável a Ca^{2+}), SLO3 (também conhecido como KSper; permeável a K^+), o trocador Na^+/H^+ específico do espermatozoide (sNHE) e cotransportador de Na^+/HCO_3^- (NBC) (MARTÍNEZ & MORROS, 1996; DARSZON *et al.*, 2006; GADELLA, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2008). Mudanças nas atividades dessas proteínas transmembranares durante a capacitação culminam na alcalinização do pHi e aumento da $[Ca^{2+}]_i$ no espermatozoide.

O aumento do pHi e da $[Ca^{2+}]_i$ estão intimamente relacionados durante a capacitação espermática (VYKLICKA & LISHKO, 2020). De fato, a alcalinização do pHi é um dos primeiros eventos associados à capacitação e um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (VYKLICKA & LISHKO, 2020). Os mecanismos associados à alcalinização do pHi dependem de variações nas concentrações intracelulares de HCO_3^- , prótons (H^+) e Na^+ (DEMARCO *et al.*, 2003). O HCO_3^- é considerado uma base fraca e seu transporte para dentro da célula é um

marcador da alcalinização do pH_i (DEMARCO *et al.*, 2003). O aumento da concentração intracelular de HCO_3^- no espermatozoide pode ser promovido via (i) difusão de CO_2 através da membrana plasmática e sua conversão a HCO_3^- pela ação de anidrases carbônicas (VYKLICKA & LISHKO, 2020); e (ii) transporte de HCO_3^- do meio extracelular para o intracelular através de cotransportadores e trocadores de íons, como os membros das famílias de transportadores carregadores de solutos (SLC), como a SLC26 e SLC4 (ANDERSON *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 2012). A família SLC4 é composta por cinco proteínas transmembranares (também conhecidos como transportadores NBC) que promovem o cotransporte HCO_3^-/Na^+ , utilizando o gradiente de Na^+ gerado pela bomba Na^+/K^+ ATPase (LIU *et al.*, 2015). Um estudo anterior demonstrou que a deleção do gene *Slc4a2*, membro da família SLC4, reduziu a quantidade de células germinativas (espermatogônia, espermátócitos) impactando diretamente na produção do espermatozoide maduro (MEDINA *et al.*, 2003).

Por sua vez, os trocadores da família SLC26, como o SLC26A3 e SLC26A6 (CHEN *et al.*, 2009; CHÁVEZ *et al.*, 2012), atuam no aumento do pH_i no espermatozoide via troca de HCO_3^- do meio extracelular pelo Cl^- , presente no meio intracelular (CHÁVEZ *et al.*, 2012) (Figura 2). Para isso, os trocadores SLC26 aproveitam o gradiente de Cl^- gerado pelo canal regulador de condutância de membrana na fibrose cística (CFTR), um canal permeável a Cl^- presente no flagelo do espermatozoide (ANDERSON *et al.*, 1991; CHÁVEZ *et al.*, 2012). Em humanos, mutações ou deleções nos genes que codificam o SLC26A3 foram associadas à infertilidade masculina, demonstrando a importância desse trocador para a função espermática (HIHNALA *et al.*, 2006; HÖGLUND *et al.*, 2006). Além disso, um estudo de modelação por homologia demonstrou que o trocador SLC26A8, membro da família SLC26, possui alta taxa de similaridade com os trocadores SLC26A3 e o SLC26A6 e com padrão de expressão específica no testículo (LOHI *et al.*, 2012). Estudos de deleção gênica para *Slc26a8* resultaram em danos permanentes no flagelo do espermatozoide, impactando diretamente na função espermática (TOURÉ *et al.*, 2007; LHUILLIER *et al.*, 2009).

O efluxo de prótons é outro mecanismo relevante para a alcalinização do pH_i espermático durante a capacitação (VYKLICKA; LISHKO, 2020). No espermatozoide humano, esse evento é mediado pelo canal de hidrogênio dependente de voltagem (Hv1), cuja abertura é disparada por

despolarização da membrana plasmática do espermatozoide associada ao influxo de Na^+ , presente em alta concentração no sistema genital feminino, via canal TRPV4 (LISHKO & KIRICHOK, 2010; TAKESHITA *et al.*, 2014; VYKLICKA & LISHKO, 2020) (Figuras 2 e 3). Em contraste, o canal Hv1 no espermatozoide murino não possui funcionalidade, sendo esta uma diferença relevante no processo de alcalinização do pH_i entre o espermatozoide humano e murino (Figuras 2 e 3) (LISHKO & KIRICHOK, 2010; RAMSEY *et al.*, 2009). Esta diferença entre espermatozoide humano e murino indica que os trocadores SLC e sNHE sejam os principais responsáveis pela alcalinização do pH_i espermático em camundongos (Figuras 2 e 3). Estudos de deleção gênica revelaram que camundongos deficientes para sNHE são inférteis em decorrência de alterações na motilidade e capacitação espermática, pelo menos em parte, via baixa atividade da ACs e consequente falhas na ativação da fosforilação de proteínas disparada pela PKA (WANG *et al.*, 2007).

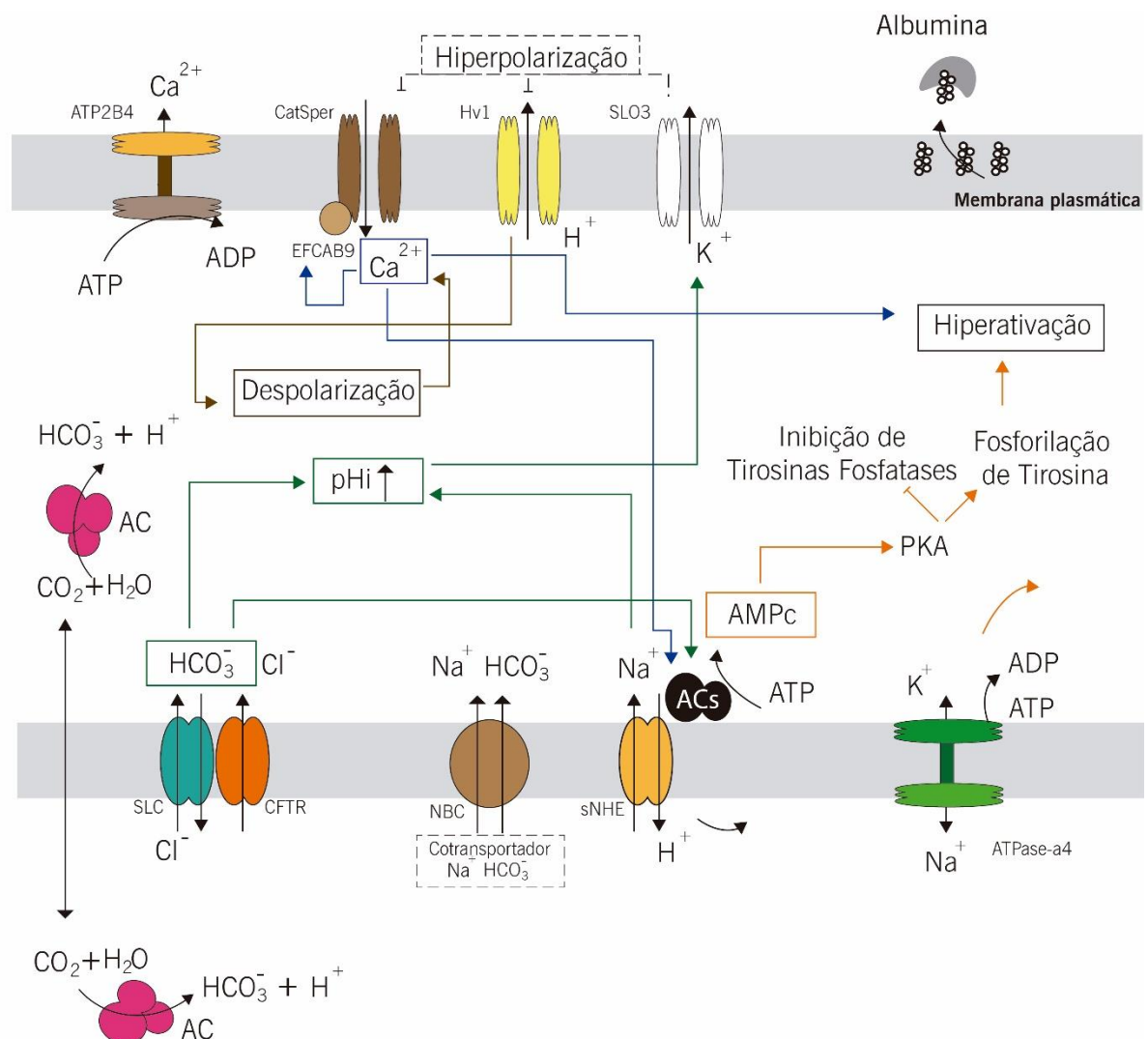


Figura 2. Modelo básico da via de sinalização durante a capacitação espermática em mamíferos. A remoção do colesterol de membrana por aceptores de colesterol, como a albumina, resulta no aumento da fluidez da membrana, hiperpolarização do potencial de membrana, aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e alcalinização do pH_i . Essas alterações na membrana promovem modificações na funcionalidade dos canais iônicos Hv1 (H^+), canal CatSper (permeável a Ca^{2+}) e SLO3 (também conhecido como K_{Sper}, K^+), trocador Na^+/H^+ (sNHE) e cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC). A abertura do canal CatSper resulta no influxo de Ca^{2+} para o interior da célula. Este canal é regulado pela entrada de Ca^{2+} através da subunidade citoplasmática EFCAB9. O mecanismo de liberação de Ca^{2+} é realizado principalmente pela ATPase (ATP2b4) e o trocador Na^+/Ca^+ . A alcalinização intracelular é mediada pela ação de trocadores sNHE. A abertura do canal Hv1 é resultado de uma breve despolarização e que acaba auxiliando na hiperpolarização o canal CatSper. A capacitação espermática é promovida pelo aumento dos níveis de HCO_3^- por meio da (i) difusão de CO_2 através da membrana plasmática e sua conversão pela anidrase carbônica (CA) ou (ii) por transporte de HCO_3^- do meio extra- para o intracelular através da interação dos cotransportadores NBC e CFTR (influxo de Cl^-). O gradiente de Na^+/K^+ que atravessa a membrana auxilia na regulação do potencial de membrana pela Na^+/K^+ ATPase- $\alpha 4$. Este gradiente auxilia na ativação dos trocadores sNHE, promovendo o influxo de Na^+ e efluxo de H^+ , garantindo a alcalinização intracelular. A entrada de K^+ ocorre através da Na^+/K^+ ATPase- $\alpha 4$ e seu efluxo acontece livremente pelo canal SLO3. O efluxo de K^+ resulta em hiperpolarização, consequentemente inibição do canal CatSper. As mudanças ocasionadas nos níveis intracelulares Ca^{2+} e a alcalinização do pH_i promovem dentre outros efeitos, ativação da ACs, consequente produção de AMPc, ativação da PKA resultando na fosforilação de tirosinas, permitindo deste modo a ativação do processo de capacitação e hiperativação espermática. As linhas cheias representam ativação, as linhas tracejadas inibição. Adaptado de (VYKLICKA & LISHKO, 2020)

O aumento do pH_i no espermatozoide promove a abertura do canal CatSper, o principal canal de Ca^{2+} responsável pelo influxo desse cátion durante a capacitação espermática em primatas e roedores (Figuras 2 e 3) (VYKLICKA & LISHKO, 2020). No espermatozoide de primatas, incluindo o humano, o canal CatSper também pode ser ativado pela progesterona e prostaglandinas (KIRICHOK & LISHKO, 2011). O canal CatSper é um complexo proteico composto por pelo menos 10 subunidades: a unidade formadora do poro contém as subunidades CatSper1 a 4, sendo estabilizada pelas subunidades auxiliares CatSper β , γ , δ , ϵ , ζ e EFCAB9 (LIN *et al.*, 2021). Estudos demonstraram que o canal CatSper está presente especificamente nas células da linhagem espermatogênica, sendo encontrado na peça principal do flagelo no espermatozoide maduro (REN *et al.*, 2001; KIRICHOK & LISHKO, 2011; SUN *et al.*, 2017). A deleção de qualquer um dos genes que codificam as subunidades principais do canal CatSper em camundongos resultam em fenótipo de infertilidade em decorrência de incapacidade de migração da motilidade progressiva para hiperativada (SUN *et al.*, 2017).

Além de regular o influxo de Ca^{2+} no espermatozoide, o aumento do pH_i intracelular também contribui para a hiperpolarização da membrana plasmática, outro evento considerado um marcador da capacitação (ARNOULT *et al.*, 1999; MUÑOZ-GARAY *et al.*, 2001). O potencial de repouso de membrana do espermatozoide varia entre -35 para -45 mV; durante a capacitação

esse valor cai para aproximadamente -70 mV (ESPINOSA & DARSZON, 1995; ZENG *et al.*, 1995). O canal de potássio específico do espermatozoide SLO3, também conhecido como K_{Sper}, é um dos principais responsáveis pela hiperpolarização do potencial de membrana durante a capacitação. O canal K_{Sper} é altamente dependente de pH e tem um papel importante na regulação da atividade do canal CatSper (Figuras 2 e 3). A deleção do gene *Kcnu1*, que codifica a subunidade principal do canal K_{Sper}, em camundongos resultou em fenótipo de infertilidade (SANTI *et al.*, 2010). De fato, a hiperpolarização do potencial de membrana via ativação do canal K_{Sper} está associada a uma série de processos fisiológicos responsáveis pela hiperativação, fosforilação de proteínas e fertilização do oócito (REN *et al.*, 2001). Vale salientar que o canal K_{Sper} também atua na regulação da atividade do canal CatSper, contribuindo para a modulação da $[Ca^{2+}]_i$ (CHÁVEZ *et al.*, 2014).

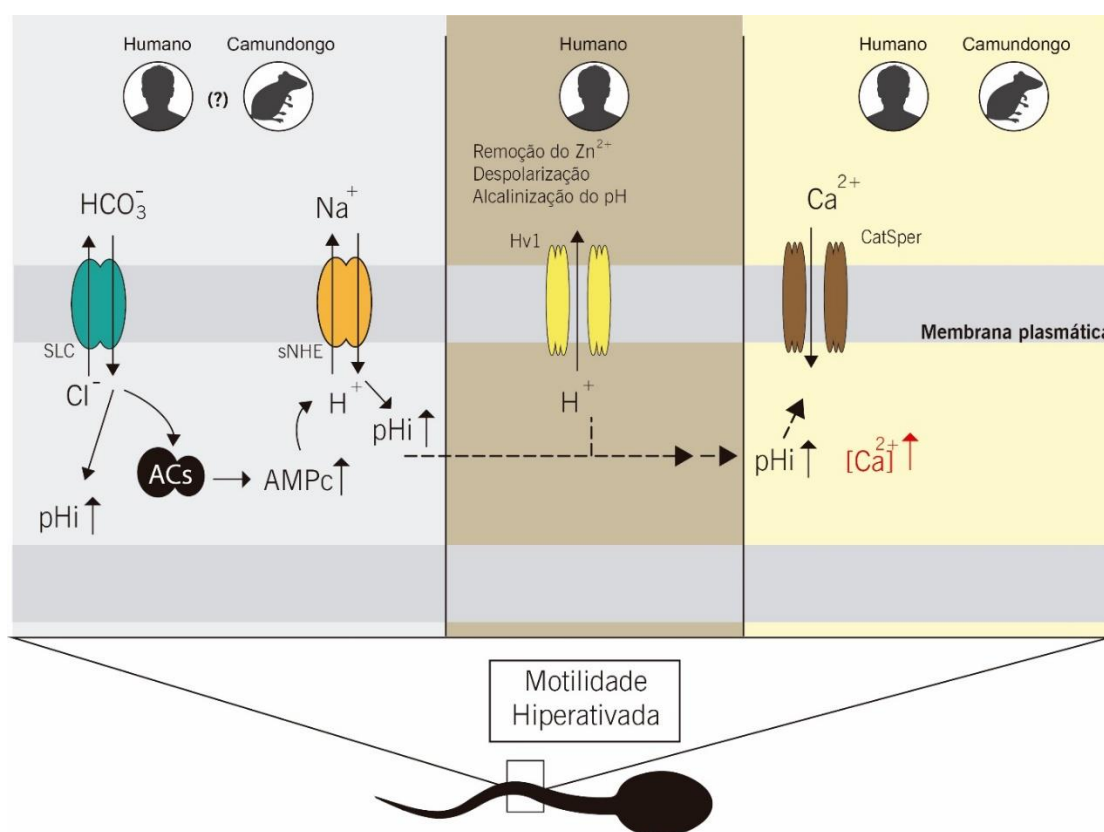


Figura 3. Diferenças na regulação de prótons e do canal Catsper entre espermatozoide humano e de camundongo. Em camundongos, a alcalinização celular é alcançada pela ativação do trocador Na^+/H^+ (sNHE) e do cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC). O NBC contribui para o acúmulo de íons HCO_3^- resultando na estimulação da ACs, que permite o aumento dos níveis de AMPc intracelular e consequentemente estimulando o trocador sNHE que contém campo de ligação para AMPc. No espermatozoide humano, a abertura do canal Hv1 está associada ao efluxo de prótons. A ativação do Hv1 contribui para a remoção do Zn^{2+} extracelular e na alcalinização do meio intracelular. Tanto no espermatozoide humano quanto de camundongo, a alcalinização celular ativa o canal CatSper permitindo a entrada de Ca^{2+} para o interior do flagelo do espermatozoide. O aumento nos níveis de cálcio resulta em hiperativação e prepara o espermatozoide para sofrer reação acrossômica. Adaptado de (LISHKO & KIRICHOK, 2010)

Uma das consequências do aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} e HCO_3^- é a ativação da enzima ACs, que por sua vez catalisa a conversão da ATP no segundo mensageiro AMPc (CHEN *et al.*, 2000) (Figura 2). O aumento da concentração intracelular de AMPc promove a ativação da PKA, principal quinase responsável pelo disparo de uma cascata de fosforilação de proteínas espermáticas em resíduos de tirosina e serina/treonina, sendo este outro evento considerado um marcador da capacitação (Figura 2) (VISCONTI *et al.*, 1995a). De fato, o aumento da abundância de fosfotirosinas durante a capacitação foi observado em espermatozoides de diferentes espécies de mamíferos, incluindo murina (VISCONTI *et al.*, 1995a), humana (LECLERC *et al.*, 1996; OSHEROFF *et al.*, 1999) e bovina GALANTINO-HOMER; *et al.*, 1997). Estudos genéticos e farmacológicos revelaram que a ACs é essencial para a função espermática (XIE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007). Os espermatozoides de camundongos *knockout* para o gene *Adcy10*, que codifica a ACs, são imóveis e incapazes de realizar o disparo da via de sinalização AMPc/PKA e consequente aumento da abundância de fosfoproteínas quando incubados em meio de cultura que sustenta a capacitação (HESS *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2011). Além disso, o fenótipo de infertilidade dos camundongos *Adcy10*^{-/-} também está associado à baixa produção de ATP pelo espermatozoide, o que resulta em defeitos na hiperativação e na capacidade de fertilizar o oócito (O'BRIEN *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que níveis intracelulares de AMPc são extremamente dinâmicos e finamente regulados pelo equilíbrio entre sua síntese e degradação (FISCH *et al.*, 1998; PUGA MOLINA *et al.*, 2018). A exposição de espermatozoides humanos e murinos a análogos permeáveis para ativação do AMPc resultou em eventos associados com a capacitação espermática, como a fosforilação de resíduos de tirosina (HARAYAMA, 2013). Assim como nas células somáticas, as enzimas fosfodiesterases (FDEs) são responsáveis pela degradação do AMPc nos espermatozoides, convertendo-o em AMP (BUCK *et al.*, 1999; PUGA MOLINA *et al.*, 2018). Os membros da família das FDEs apresentam diferentes especificidades em seus substratos e em suas atividades farmacológicas (WASCO & ORR, 1984). As isoformas FDE4, FDE7 e FDE8 são mais seletivas para o AMPc, enquanto a FDE5, FDE6 e FDE9, para a guanosina monofosfato

cíclico (GMPc) (CONTI & BEAVO, 2007) Em adição, FDE1, FDE2, FDE3, FDE10, FDE11 catalisam tanto o AMPc quanto GMPc. Os membros da família de FDEs apresentam um padrão de expressão amplamente diversificado e podem ser encontrados em células da linhagem germinativa (espermátogônia, espermátócitos e espermátides), células de suporte (células de Sertoli) e também no espermatozoide maduro (GUIPPONI *et al.*, 1998; LEFIÈVRE *et al.*, 2002; D'ANDREA *et al.*, 2005). Um exemplo da atuação das fosfodiesterases sobre a fertilidade masculina pode ser observado com a FDE11. Esta enzima possui uma grande expressão no testículo, próstata e exerce um papel importante durante o desenvolvimento do espermatozoide (WAYMAN *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2014). A deleção da *Fde11* em camundongos resultou em baixa concentração espermática, redução da motilidade progressiva, e no percentual de espermatozoides viáveis (WAYMAN *et al.*, 2005).

Um dos principais alvos do AMPc é a PKA, uma serina/treonina quinase que exerce um papel fundamental na biologia espermática (BURTON & MCKNIGHT, 2007). A PKA é composta por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). A ligação do AMPc à subunidade R da PKA resulta na ativação de sua subunidade C, culminando na fosforilação de resíduos de serina e treonina em seus substratos proteicos (AITKEN & NIXON, 2013; VISCONTI *et al.*, 2011; BARO GRAF *et al.*, 2020). Em mamíferos, foram descritas duas isoformas da subunidade R (PKA-RI e RII) e três da subunidade C (PKA-C α , C β e C γ) (UHLER *et al.*, 1986). A subunidade C α apresenta duas variantes definidas como C α 1 e C α 2, sendo esta última restrita às células germinativas masculinas (WIESNER *et al.*, 1998; NOLAN *et al.*, 2004). Dessa forma, a C α 2 é isoforma da subunidade catalítica da PKA específica do espermatozoide maduro (WIESNER *et al.*, 1998; NOLAN *et al.*, 2004). Camundongos knockout para o gene *C α 2*^{-/-} apresentam defeitos na função e qualidade espermática, resultando em fenótipo de infertilidade (SKÅLHEGG *et al.*, 2002).

Curiosamente, a própria PKA também é passível de fosforilação, modificação pós-traducional que influencia na sua atividade catalítica (CAUTHRON *et al.*, 1998; SHOJI *et al.*, 1979). De fato, a subunidade catalítica da PKA possui dois sítios de fosforilação; um próximo da região C-terminal (Ser388) e um em seu loop de ativação (Thr197) (YONEMOTO *et al.*, 1997).

Vale ressaltar que o impacto da fosforilação da PKA na função espermática ainda é pouco conhecido.

Em conjunto, os eventos moleculares associados à capacitação descritos acima culminam em alterações funcionais essenciais para o potencial fértil do espermatozoide, incluindo indução de motilidade hiperativada e preparação para a exocitose acrossomal. A seguir, abordaremos os aspectos funcionais básicos associados à capacitação espermática.

2.2.2. Eventos funcionais associados a capacitação espermática

A motilidade espermática descreve a habilidade do espermatozoide de se locomover através do sistema reprodutor feminino para fertilizar o ócito (SUAREZ, 2008). Ela é 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 no fluído que o banha (TURNER, 2006). Os espermatozoides encontram-se imóveis enquanto estão estocados na cauda do epidídimo e a motilidade só é adquirida após a ejaculação ou seu isolamento da cauda do epidídimo de sistemas modelos, como ratos e camundongos (GANGWAR & ATREJA, 2015).

Na maioria das espécies, incluindo humanos e camundongos, os espermatozoides apresentam diferentes padrões de motilidade, sendo os principais a motilidade ativada e hiperativada (Figura 4) (MORTIMER, 2000; SUAREZ & HO, 2003). A motilidade ativada é observada em espermatozoides recém-ejaculados ou isolados do epidídimo, podendo ser progressiva ou não. A motilidade progressiva é uma característica fundamental do espermatozoide maduro, sendo definida por movimentos flagelares relativamente simétricos e de alta frequência, resultando em movimentos rápidos e progressivos (Figura 4) (MORTIMER *et al.*, 1998; SUAREZ, 2008; SUAREZ & HO, 2003).

Um dos eventos observados durante a capacitação é a mudança do padrão de motilidade espermática de progressivo para hiperativado (SUAREZ *et al.*, 1987; SUAREZ & HO, 2003). Os espermatozoides com motilidade hiperativada exibem curvas flagelares assimétricas, alta

amplitude flagelar e trajetória não progressiva ou circular (SUAREZ, 2008) (Figura 4). Não se sabe ao certo o momento exato em que a hiperativação ocorre durante o processo de capacitação e se, necessariamente, é uma etapa essencial ou que ocorre concomitantemente a este evento (KAY & ROBERTSON, 1998; HO & SUAREZ, 2001; SUAREZ & HO, 2003). No entanto, a hiperativação é um evento essencial para a fertilidade, visto que é necessária para o movimento espermático adequado em ambientes viscosos, como o muco do oviducto e penetração nas camadas externas do oócito durante a fertilização (TURNER, 2006; FREITAS *et al.*, 2017). De fato, espermatozoides cuja motilidade não migra de ativada para hiperativada são inférteis (SUN *et al.*, 2017). Por exemplo, o fenótipo de infertilidade causado pela deleção de genes que codificam as diferentes subunidades do canal CatSper em camundongos está associado à ausência de hiperativação dos espermatozoides, embora estes sejam móveis (SUN *et al.*, 2017). Nesse contexto, destacamos o papel fundamental dos canais CatSper para a indução da motilidade hiperativada, sendo o único canal de Ca_2^+ necessário para esse processo (SINGH & RAJENDER, 2015).

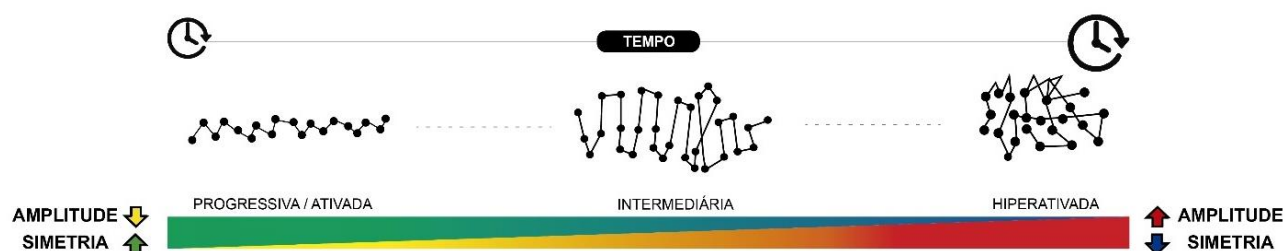


Figura 4. Principais padrões de motilidade espermática. A motilidade progressiva ou ativada é observada em espermatozoides recém ejaculados ou isolados da cauda do epidídimo, caracteriza-se por movimentos flagelares simétricos e vigorosos. A motilidade hiperativada está associada ao processo de capacitação espermática, é caracterizada por curvas flagelares assimétricas, batimentos flagelares de alta amplitude e trajetória circular ou irregular. Adaptado de FLORMAN & DUCIBELLA, 2006

A capacitação também torna os espermatozoides aptos para a exocitose acrossomal (também conhecida como reação acrossômica), um dos últimos eventos antes da fertilização (BALESTRINI *et al.*, 2020). A reação acrossômica é um evento do tipo excitatório que resulta na fusão da membrana plasmática com a membrana externa do acrossoma, uma vesícula que cobre parte da cabeça do espermatozoide (Figura 1) (BALESTRINI *et al.*, 2020). Trata-se de um evento irreversível, que resulta na liberação de enzimas, como acrosina (TAKANO *et al.*, 1993) e

calpaínas (GOLL *et al.*, 2003), essenciais para que o espermatozoide penetre na zona pelúcida e se funda à membrana plasmática do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Consistentemente, a reação acrossômica induz a exposição de proteínas da cabeça do espermatozoide ou sua migração para o segmento equatorial, o que facilita sua interação com proteínas da superfície do oócito (BALESTRINI *et al.*, 2020). Um exemplo desse fenômeno ocorre com a proteína espermática IZUMO1, uma proteína essencial para a fusão espermatozoide-oócito localizada na membrana do acrossoma no espermatozoide intacto (INOUE *et al.*, 2005; SATOUH *et al.*, 2012). Durante a reação acrossômica, a IZUMO1 migra para o segmento equatorial tornando-se disponível para formar uma rede de interações com proteínas do oócito tornando o espermatozoide competente para a fusão (SATOUH *et al.*, 2012).

A reação acrossômica é estimulada por indutores naturais (endógenos), como proteínas da zona pelúcida do oócito, como a ZP3, e a progesterona, hormônio secretado pelas células do cúmulus (BUFFONE *et al.*, 2012). Além disso, ela também pode ser induzida por indutores exógenos, como o ionóforo de cálcio A23187 e K^+ (BUFFONE *et al.*, 2012; BALESTRINI *et al.*, 2020). De fato, o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} é um evento essencial para o disparo da reação acrossômica (BELMONTE *et al.*, 2016). Nesse caso, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ depende de uma integração de sinais envolvidos na liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares presentes no acrossoma via receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3), e do influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem do tipo Ca_v e possivelmente canais CatSper (DARSZON *et al.*, 2011).

3. Proteínas espermáticas como alvo para contracepção masculina

Conforme discutido no item anterior, o espermatozoide dispõe de um arranjo de macromoléculas específicas com papéis essenciais para o seu funcionamento adequado, incluindo aquisição de motilidade, hiperativação, reação acrossômica e outros eventos associados à capacitação. Deste modo, essas macromoléculas emergem como alvos farmacológicos viáveis para o desenvolvimento de métodos contraceptivos masculinos baseados na inibição da função do espermatozoide maduro (JIMENEZ *et al.*, 2011; MANNOWETZ *et al.*, 2017). Essa estratégia para contracepção masculina possui como principais vantagens: (i)

possibilidade de uso sob demanda, visto que não interfere com processos associados à produção ou maturação espermática, o que reduz o período de latência terapêutica e para reversibilidade do efeito contraceptivo, (ii) perfil de segurança favorável, pois tem como alvo farmacológico macromoléculas de expressão específica ou seletiva no espermatozoide, e (iii) não é necessário o desenvolvimento de fármacos capazes de atravessar a barreira hemato-testicular, reduzindo desafios associados aos seus perfis farmacocinéticos. A seguir, apresentamos algumas proteínas espermáticas consideradas alvos promissores para a contracepção masculina que tem como alvo o espermatozoide.

A CRISP1 é um membro da família de proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISP 1-4). Em humanos e camundongos, a CRISP1 é secretada pelas células epiteliais do epidídimo, sendo encontrada na superfície de espermatozoides (KOHANE *et al.*, 1980; COHEN *et al.*, 2000). Seu papel chave na fertilidade foi observado quando ratos imunizados com CRISP1 recombinante apresentaram redução da taxa de fertilidade (ELLERMAN *et al.*, 2008). Em harmonia com esses achados, espermatozoides de camundongos knockout para o gene *Crisp1* (*Crisp1*^{-/-}) demonstraram ser menos eficazes na fertilização *in vitro* de oócitos livres de cúmulos e desnudados, indicando que a CRISP1 desempenha um papel essencial na interação do espermatozoide com a zona pelúcida (DA ROS *et al.*, 2008). Estudos mais recentes demonstraram que a CRISP1 e também outros membros dessa família regulam a atividade dos canais CatSper, sendo necessários para mudanças no movimento flagelar associadas à hiperativação (ERNESTO *et al.*, 2015). Deste modo uma abordagem contraceptiva para CRISP1 envolve a utilização de anticorpos anti-CRISP1 ou de moléculas de baixo peso molecular com propriedades farmacodinâmicas semelhantes a estes anticorpos que interfiram na interação espermatozoide oócito ou no processo de hiperativação (DA ROS *et al.*, 2008; COHEN *et al.*, 2011).

Outro alvo promissor é a isoforma da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase específica do espermatozoide (GAPDS), cuja expressão está restrita aos espermatócitos e espermátides redondas e alongadas (BUNCH *et al.*, 1998). No espermatozoide maduro, a GAPDS está associada com o citoesqueleto flagelar, desempenhando um papel crítico para a motilidade progressiva. Estudos de deleção gênica para *Gapds* resultaram em camundongos

com contagem espermática dentro dos padrões de normalidade, mas inférteis, em decorrência da ausência de motilidade progressiva e baixos níveis de ATP (MIKI *et al.*, 2004; WESTHOFF & KAMP, 1997). De maneira interessante, a incubação de espermatozoides de ratos com concentrações crescentes do inibidor seletivo da GAPDS (S)- α -cloridrina (SACH) reduziu a produção de AMPc e a fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina e de substratos da PKA induzidas pela capacitação (ZHANG *et al.*, 2012). Em conjunto, esses estudos indicam que inibidores seletivos da GAPDS podem ser estratégias viáveis para contracepção masculina por inibição da função espermática.

Outra estratégia promissora para a inibição farmacológica da função espermática é focar no bloqueio dos canais iônicos específicos do espermatozoide, como o CatSper e o KSper. Por exemplo, o composto experimental HC-056456 bloqueou seletivamente o canal CatSper no espermatozoide murino, o que resultou na inibição das correntes de Ca^{2+} responsáveis pela hiperativação (CARLSON *et al.*, 2009). De forma interessante, o HC-056456 inibiu a hiperativação sem alterar a motilidade progressiva dos espermatozoides expostos ao composto, de forma semelhante ao observado com espermatozoides dos camundongos *knockout* para as subunidades que compõe o canal (CARLSON *et al.*, 2003, 2009; QI *et al.*, 2007; QUILL *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2001). A inibição da migração da motilidade progressiva para hiperativada induzida pelo HC-056456 foi acompanhada pela redução das taxas de fertilização em modelo de inseminação artificial, indicando a viabilidade dessa estratégia para contracepção masculina (CURCI *et al.*, 2021).

Vale destacar que as estratégias para contracepção masculina não-hormonal ainda estão em fase de caracterização ou desenvolvimento pré-clínico e muito ainda precisa ser feito em termos de investigação científica e desenvolvimento farmacológico para que tais estratégias alcancem os estágios de investigação clínica. Como fruto desses esforços, outras moléculas espermáticas que não se encaixam no grupo de macromoléculas alvos clássicas de fármacos (receptores farmacológicos, canais iônicos e outras proteínas reguladas por ligantes) emergiram como novas opções de alvos farmacológicos para contracepção masculina (O'RAND *et al.*, 2016). Dentre as moléculas que se encaixam neste perfil, nosso laboratório tem se dedicado ao

estudo da proteína EPPIN (do inglês, *Epididymal protease inhibitor*), que é considerada um dos mais promissores alvos farmacológicos para a contracepção masculina.

4. EPPIN

A EPPIN é uma proteína rica em resíduos de cisteína, contendo domínios inibitórios de serina-proteases do tipo WFDC (*Whey acidic protein-type four disulfide core*) e Kunitz nas regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente (Figura 5A, B). O gene *EPPIN* está localizado no cromossomo 20, região 20q12-q13 humano e codifica uma proteína de secreção de 133 resíduos de aminoácidos, cuja expressão é dependente de androgênio (RICHARDSON *et al.*, 2001). Loci ortólogos conservados do gene *EPPIN* foram encontrados nos cromossomos 2 e 3 de camundongos e ratos, respectivamente (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; CLAUSS *et al.*, 2005).

Estudos de expressão gênica em humanos e roedores revelaram que a EPPIN é abundantemente expressa no testículo e epidídimo, como produto de secreção das células de Sertoli e epiteliais, respectivamente (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012a; MARIANI *et al.*, 2020). Vale destacar que embora o testículo e o epidídimo sejam os sítios de maior expressão da EPPIN, ela também foi detectada em outros órgãos reprodutivos, como ducto deferente e glândula seminal em ratos e camundongos (SILVA *et al.*, 2012a; MARIANI *et al.*, 2020) e alguns não-reprodutivos, incluindo a traqueia, em humanos (CLAUSS, 2002), a glândula adrenal em camundongos (MARIANI *et al.*, 2020) e o cérebro, em ratos (SILVA *et al.*, 2012a). De maneira interessante, estudos de *Western blot* utilizando extratos proteicos totais de tecidos e espermatozoides demonstraram que a EPPIN se apresenta em diferentes massas moleculares aparentes, provavelmente devido às suas propriedades físico-químicas (p.ex., alto ponto isoelétrico), processamento diferencial da forma inteira e secretada (sem o peptídeo sinal) e capacidade de formar dímeros e oligômeros (O'RAND *et al.*, 2006; O'RAND *et al.*, 2011). Por exemplo, um estudo recente do nosso grupo demonstrou a presença da EPPIN em diferentes massas moleculares de ~14 e 19 kDa, correspondentes a EPPIN processada (sem o peptídeo sinal) e não-processada, respectivamente; dímero (~28-38 kDa) e oligômero (~39-65 kDa) em extratos proteicos totais de testículo, epidídimo e espermatozoides epididimários de

camundongos (MARIANI *et al.*, 2020). Esses dados reforçam a alta complexidade estrutural da EPPIN, o que influencia no seu caráter multifuncional.

Diversos estudos confirmaram a presença da EPPIN em células da linhagem espermatogênica e na superfície de espermatozoides epididimários e ejaculados, o que sugere seu envolvimento em eventos relacionados à função espermática (RICHARDSON *et al.*, 2001; SIVASHANMUGAM *et al.*, 2003; GUO & WANG, 2005; WANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012a; MARIANI *et al.*, 2020). Nesse contexto, dados do nosso grupo demonstraram que a distribuição da EPPIN na superfície do espermatozoide variou conforme seu trânsito pelo epidídimo de ratos e camundongos, sendo mais abundante em espermatozoides maduros coletados das regiões mais distais do órgão (corpo e cauda), indicando uma relação entre a maturação espermática pós-testicular e a dinâmica da localização da EPPIN no espermatozoide maduro (SILVA *et al.*, 2012b; MARIANI *et al.*, 2020). Vale salientar, entretanto, que as funções da EPPIN em eventos associados à maturação espermática, bem como sua estabilidade relativa no espermatozoide durante a capacitação ainda permanecem obscuros.

A EPPIN possui atividade bactericida, fornecendo proteção ao espermatozoide contra ameaças patogênicas durante sua jornada pelo trato reprodutor feminino (YENUGU *et al.*, 2004; MCCRUDDEN *et al.*, 2008), e inibidora de serino-proteases, como a PSA, enzima de origem prostática envolvida na liquefação do sêmen de primatas após a ejaculação (WANG *et al.*, 2007). Além disso, a EPPIN presente na superfície do espermatozoide humano atua como elemento central de interação com outras proteínas de interação com o espermatozoide: lactotransferrina (LTF), clusterina (CLU) e, após a ejaculação com a semenogelina-1 (SEMG1), formando um complexo multiproteico conhecido como EPPIN protein complex– EPC (WANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012b; SILVA *et al.*, 2013).

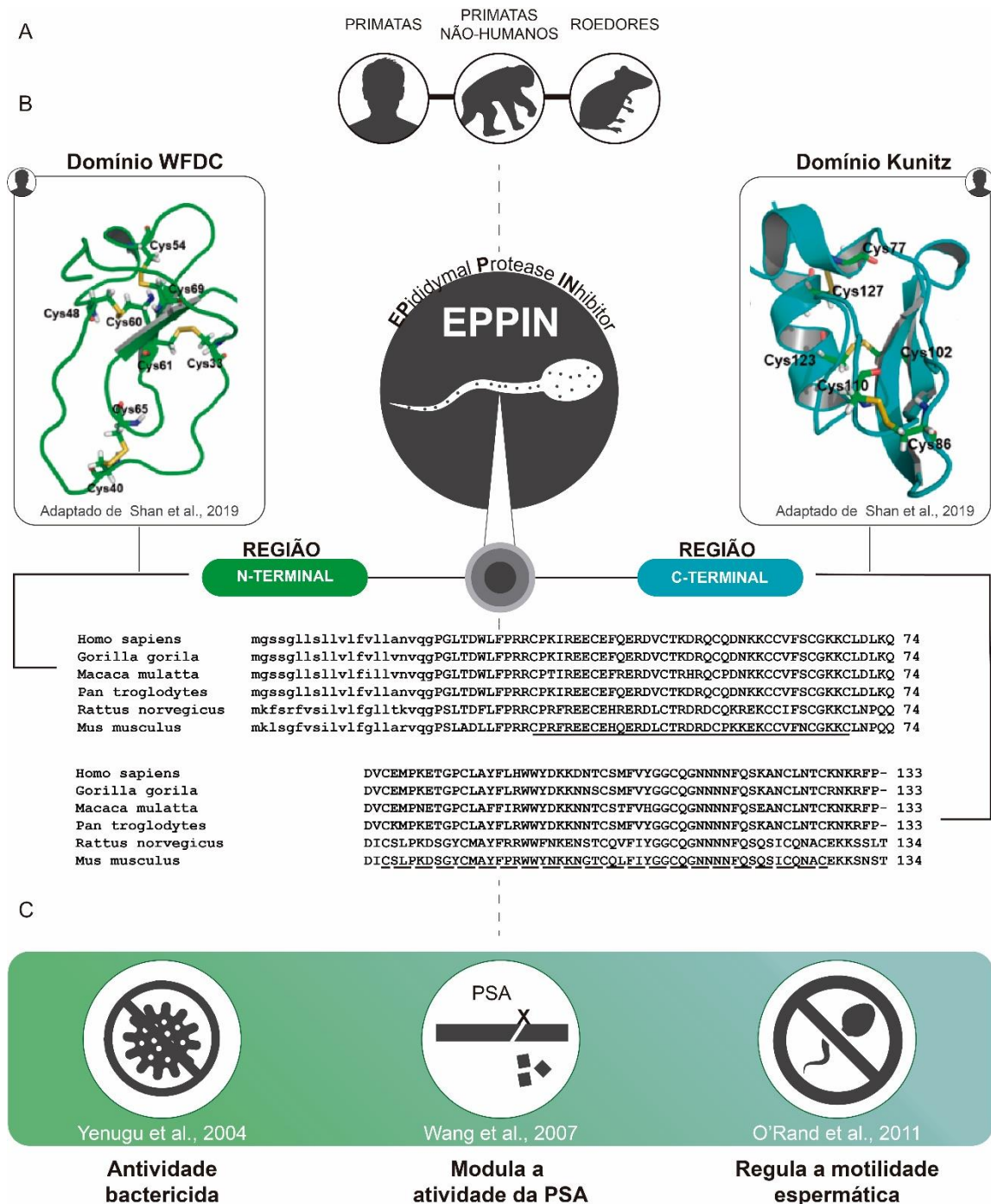


Figura 5. EPPIN: Aspectos estruturais e funcionais. (A, B) Alinhamento da sequência primária da EPPIN de primatas, primatas não-humanos e roedores. Números de acesso NCBI: *Homo sapiens*: NP_065131; *Gorilla gorilla*: XP_004062305; *Pan troglodytes*: BAK61916; *Macaca mulatta*: NP_001028013; *Mus musculus*: NP_083601; *Rattus norvegicus*: NP_001102927. Os domínios WFDC e Kunitz estão sublinhados com linha contínua e pontilhada, respectivamente. Estrutura de modelagem homóloga de EPPIN após simulação por dinâmica molecular. Modelo de homologia do domínio N-terminal (23-74 – lado esquerdo) e domínio C-terminal (75-133 – lado direito) em EPPIN proteína (ligações dissulfeto são destacadas como bastões). Adaptado de Shan et al., 2019. (C) Funções fisiológicas da EPPIN: Alta atividade bactericida, atua como moduladora da atividade proteolítica da PSA e também regula a motilidade espermática.

A interação da EPPIN com a SEMG1, proteína mais abundante do plasma seminal, na superfície do espermatozoide promove inibição temporária da motilidade espermática após a ejaculação (O'RAND *et al.*, 2011) (Figura 5C). A SEMG1 também atua como fator inibitório da capacitação espermática, atuando no controle temporal fino da função espermática e garantindo que o gameta masculino conserve energia e alcance seu ápice funcional no momento adequado (DE LAMIRANDE *et al.*, 2001; O'RAND *et al.*, 2004). Dados recentes demonstraram que em camundongos, a EPPIN interage com uma proteína do plasma seminal conhecida como a SVS2, ortóloga a SEMG1 no homem, dando suporte a hipótese que a EPPIN possui funções conservadas tanto em humano quanto em camundongo (MARIANI *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram que a interação EPPIN-SEMG1 ou EPPIN-SVS2 na superfície espermática é um evento essencial para a fertilidade.

Em conjunto, esses resultados demonstram que a EPPIN é uma proteína multifuncional do trato reprodutor masculino, apresentando papéis em funções imunológicas e reprodutivas. Tanto SEMG1 quanto SVS2 inibem a capacitação, hiperativação e reação acrossômica enquanto permite a sobrevivência do espermatozoide no útero (DE LAMIRANDE *et al.*, 2001; SAKAGUCHI *et al.*, 2020). Consistentemente, diferentes polimorfismos de nucleotídeo único nos genes SEMG1 e EPPIN humana estão associadas com risco de infertilidade idiopática em homens com baixo parâmetros de motilidade (DING *et al.*, 2010a; DING *et al.*, 2010b).

O bloqueio da EPPIN na superfície do espermatozoide de primatas com anticorpos anti-EPPIN, que reconhecem epítomos no domínio Kunitz da proteína, mimetizaram o efeito da SEMG1, resultando na inibição da motilidade espermática (O'RAND *et al.*, 2004). Este estudo revelou dois epítomos com potencial contraceptivo: um presente no domínio WFDC (sequência ²⁰QGPGLTDWLFPR³¹) e outro no domínio Kunitz (sequência ¹⁰¹TCSMFVYGGCQGNNNNFQ¹¹⁸) (O'RAND *et al.*, 2004). De fato, estudos *in vitro* revelaram que o anticorpo anti-EPPIN S21C, que reconhece epítopo na região C-terminal da proteína (domínio Kunitz; Figura 5B), inibiu a motilidade do espermatozoide humano (MARTINEZ *et al.*, 2008; O'RAND *et al.*, 2009). O mesmo anticorpo também competiu com a SEMG1 pela ligação à EPPIN, indicando que o domínio Kunitz da EPPIN possui sequências comuns de interação com a SEMG1 e com o anticorpo anti-EPPIN S21C (O'RAND *et al.*, 2011). Esses resultados reforçaram o princípio de que a EPPIN pode ser

explorada como alvo para o desenho racional de fármacos espermostáticos, que atuem mimetizando as ações da SEMG1 e, conseqüentemente, inibindo a motilidade espermática. De fato, a EPPIN vem sendo investigada para o desenvolvimento de moléculas orgânicas de baixo peso molecular, como os compostos B4 e EP055, cuja interação com essa proteína acarretou na inibição da motilidade espermática *in vitro* (O'RAND *et al.*, 2009, 2016).

Mais recentemente, estudos de bioinformática utilizando a EPPIN humana inteira indicaram que aminoácidos presentes na região N-terminal da EPPIN, como Arg32 e Arg33, poderiam estar envolvidas na interação com a SEMG1 e interações intramoleculares com o domínio Kunitz e WFDC (SHAN *et al.*, 2019). Isso demonstra que ambos os domínios, WFDC e Kunitz, podem desempenhar papéis complementares ou diferentes na função da EPPIN como elemento modulador da motilidade espermática. Esta hipótese tem suporte em outros achados que demonstraram a atividade bactericida da EPPIN recombinante inteira é maior do que seus domínios isolados (MCCRUDEN *et al.*, 2008). Em paralelo, a atividade inibitória da elastase foi observada apenas no domínio Kunitz e com a EPPIN inteira, mas não no domínio WFDC (YENUGU *et al.*, 2004; MCCRUDEN *et al.*, 2008). Porém, as contribuições relativas da EPPIN e seus domínios sobre a regulação da motilidade espermática ainda precisam ser determinadas.

Apesar desses avanços, aspectos do mecanismo de ação da EPPIN em eventos de espermáticos, como motilidade e hiperativação, bem como na maturação pós-testicular ainda são pouco conhecidos. Nesse contexto, melhorar o conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais a EPPIN modula a função espermática é fundamental para avançar no seu desenvolvimento como alvo para contracepção masculina. Nesse contexto, exploramos o camundongo como modelo experimental para investigarmos o papel dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN em eventos associados à motilidade e capacitação espermática, bem como o impacto dos eventos de maturação pós-testicular sobre a expressão e distribuição celular da EPPIN.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Investigar o papel dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN em eventos associados à motilidade a capacitação espermática, bem como o impacto dos eventos de maturação pós-testicular sobre a expressão e distribuição celular da EPPIN.

2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito do trânsito epididimário e capacitação espermática in vitro sobre a localização estabilidade relativa da EPPIN no espermatozoide murino.
- Avaliar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C, F21C e Q20E altera os padrões de motilidade ativada e hiperativada.
- Avaliar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E modifica os níveis intracelulares de AMPc induzidos pela capacitação.
- Investigar se a incubação de espermatozoides murinos com anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E reduz os níveis de fosforilação da proteína quinase A (PKA) induzida pela capacitação.

Capítulo 2

Artigo apresentado segundo as regras do periódico: **Scientific Reports**

Fator de impacto: 4.379 (2020)

Instruções aos autores: <https://www.nature.com/srep/author-instructions/submission-guidelines>

Differential effects of antibodies mapping EPPIN N-terminal and C-terminal sequences on the regulation of mouse sperm motility

Abstract

EPPIN is a sperm-binding protein displaying an N-terminal WFDC domain and a C-terminal Kunitz domain. Ligands targeting the EPPIN Kunitz domain inhibited sperm motility, thus validating EPPIN as an attractive drug target for non-hormonal male contraception. Nevertheless, little is known on the relative contributions of EPPIN WFDC and Kunitz domains to the regulation of sperm function. This study reports that anti-EPPIN antibodies mapping epitopes in WFDC (Q20E antibody) and Kunitz (S21C and F21C antibodies) domains differentially modulated mouse sperm motility *in vitro*. We detected EPPIN in mouse sperm soluble fraction, membrane enriched-fraction, and in association with cytoskeleton structures. S21C, but not F21C antibody (0.4 mg/ml), inhibited sperm progressive and hyperactivated motility in a time-dependent manner. S21C antibody impaired kinematic parameters describing progressive (VSL, VAP, and STR) and vigorous sperm movements (VCL, ALH, and LIN). Conversely, Q20E antibody (0.6 mg/ml) induced mild inhibition of progressive motility and kinematics parameters (VAP, VCL, and ALH). We conclude that the EPPIN Kunitz domain plays key roles in regulating mouse sperm motility and hyperactivation, and its WFDC domain may contribute to these effects. These findings may contribute to male contraceptive drug design targeting EPPIN.

Introduction

Sperm-binding proteins with essential roles in sperm function are promising targets for non-hormonal, fast-onset, loss-of-function male contraceptive drug development. Due to its druggable properties and involvement in the regulation of sperm motility, the cysteine-rich protein EPPIN (Epididymal protease inhibitor) is a compelling sperm target for male contraception¹⁻³.

EPPIN contains two protease inhibitor-type domains in its primary sequence: a WFDC (Whey-acidic protein four-disulfide core) domain in the N-terminal region and a Kunitz domain in the C-terminal region. In different mammalian species, including man and mouse, EPPIN expression is mainly detected, albeit not limited, to the testis and epididymis⁴⁻⁶. EPPIN is found in the head and flagellum of mature spermatozoa, where it acts as a central nod for protein-protein interactions that regulate sperm function upon ejaculation^{7,9,10}. EPPIN binds to the semen coagulum protein semenogelin-1 (SEMG1) in human spermatozoa, yielding a temporary loss of sperm progressive motility upon ejaculation¹¹⁻¹⁵. Similarly, EPPIN is a docking site for the seminal vesicle-secreted protein 2 (SVS2), a SEMG1 ortholog, in mouse spermatozoa, supporting the hypothesis that EPPIN roles on sperm function are conserved between humans and mice⁶. Human SEMG1 and mouse SVS2 inhibit sperm capacitation, hyperactivation, and acrosome reaction while promoting sperm survival in the uterus¹¹⁻¹⁵. These results indicate that EPPIN binding is a crucial event for the modulation of sperm function by SEMG1 and SVS2 alike. Consistently, different single nucleotide polymorphisms in the human *EPPIN* gene have been associated with decreased or increased risk of idiopathic infertility in men with poor semen parameters¹⁶.

The demonstration that active immunization of male monkeys with recombinant human EPPIN resulted in high anti-EPPIN antibody titers, leading to effective and reversible male infertility triggered its development as a contraceptive drug target¹⁷. Further studies showed that contraceptive anti-EPPIN antibodies and SEMG1 possess overlapping binding sites in the EPPIN Kunitz domain^{18,19,10,1}. We previously demonstrated that the sequence Tyr107-Phe117 in the EPPIN Kunitz domain contains critical residues for SEMG1 binding and regulation of sperm motility^{19,10,1}. This knowledge facilitated the design of experimental small organic ligands targeting

the EPPIN C-terminus, such as the compound EP055, which showed sperm motility inhibitory activity in both in vitro and in vivo models²⁰.

More recently, bioinformatics studies using full-length human EPPIN homology models indicated that amino acid residues in EPPIN N-terminus, such as Arg32 and Arg33, could be involved in both SEMG1 binding and intramolecular interactions between the Kunitz and WFDC domains⁷. These findings are in agreement with observations that both EPPIN WFDC and Kunitz domains play differential roles in EPPIN functions. For instance, the EPPIN Kunitz domain, but not its WFDC domain, inhibited neutrophil elastase and serine protease prostate-specific antigen (PSA)⁸, whereas both domains contributed to its antimicrobial activity^{22,23}. Nevertheless, the relative contributions of EPPIN WFDC and Kunitz domains to the regulation of sperm function are yet to be determined.

Here, we report that different anti-EPPIN antibodies mapping to epitopes in EPPIN N-terminal (Q20E antibody) and C-terminal (S21C and F21C antibodies) sequences differentially modify mouse sperm motility and capacitation parameters. We show that S21C, but not F21C antibody inhibited mouse sperm motility (progressive and hyperactivated) and kinematics parameters describing both progressive (VSL, VAP, and STR) and vigorous (VCL, ALH, and LIN) movements in a time-dependent manner. On the other hand, Q20E antibody showed mild effects on progressive motility and sperm kinematics parameters. Altogether, our results shed new light on the roles played by EPPIN domains in regulating sperm function, thus contributing to its development as a contraceptive drug target

Results

EPPIN is differentially associated with sperm surface and cytoskeleton structures during post-testicular maturation

Using rodent models (rats and mice), we previously demonstrated that EPPIN distribution dynamically changes in sperm head and flagellum during epididymal transit^{6,10}. Here, we took a step further by investigating EPPIN compartmentalization in spermatozoa during two different stages of post-testicular: epididymal maturation and capacitation.

Our Western blot results showed a differential EPPIN expression pattern in Triton X-100 soluble (S) and insoluble (P) fractions from spermatozoa isolated from different epididymal regions (Fig. 1a). Using anti-EPPIN Q20E antibody, which maps the sequence Gln20-Glu39 in the EPPIN N-terminal region (Table 1), we observed two EPPIN-positive immunoreactive bands with apparent molecular masses of ~14 kDa and ~28 kDa in the S fraction of spermatozoa isolated from caput, corpus, and cauda epididymidis (Fig. 1a). We observed a different band of ~19 kDa band and higher bands in the range of ~47-65 kDa in the P fraction of spermatozoa isolated from corpus and cauda epididymidis, but not from caput region (Fig. 1a). We observed similar results when samples were processed for SDS-PAGE in non-reducing conditions (Supplementary Fig. S1 online). Moreover, capacitation in vitro using spermatozoa isolated from the cauda epididymidis did not affect the pattern of EPPIN-positive immunoreactive bands in comparison to non-capacitated spermatozoa (Supplementary Fig. S1 online). We detected no immunoreactive bands when experiments were performed using anti-EPPIN Q20E antibody pre-adsorbed with recombinant EPPIN (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1 online).

To better define the presence of EPPIN in sperm subcellular compartments, we obtained subcellular fractions of cauda epididymis spermatozoa by cell fractionation²⁴. Consistent with our previous findings, Western blot analysis using TE buffer-soluble fraction (S10) revealed two major EPPIN-positive immunoreactive bands with apparent molecular masses of ~14 and ~28 kDa, as well as a faint band of ~47 kDa (Fig. 1b). In parallel, we observed four bands with apparent molecular masses of ~14, ~19, ~47, and ~65 kDa in the TE buffer-insoluble fraction (P10), which contains sperm organelles and flagellum-associated proteins²⁴ (Fig. 1b). Ultracentrifugation of the S10 fraction (100,000 x g) resulted in the P100 and S100 fractions, containing mostly membranes and soluble proteins, respectively²⁴. We observed that both ~14 and ~28 kDa bands remained in the S100 fraction, while the ~47 kDa band was found in S100 and P100 fractions (Fig. 1b).

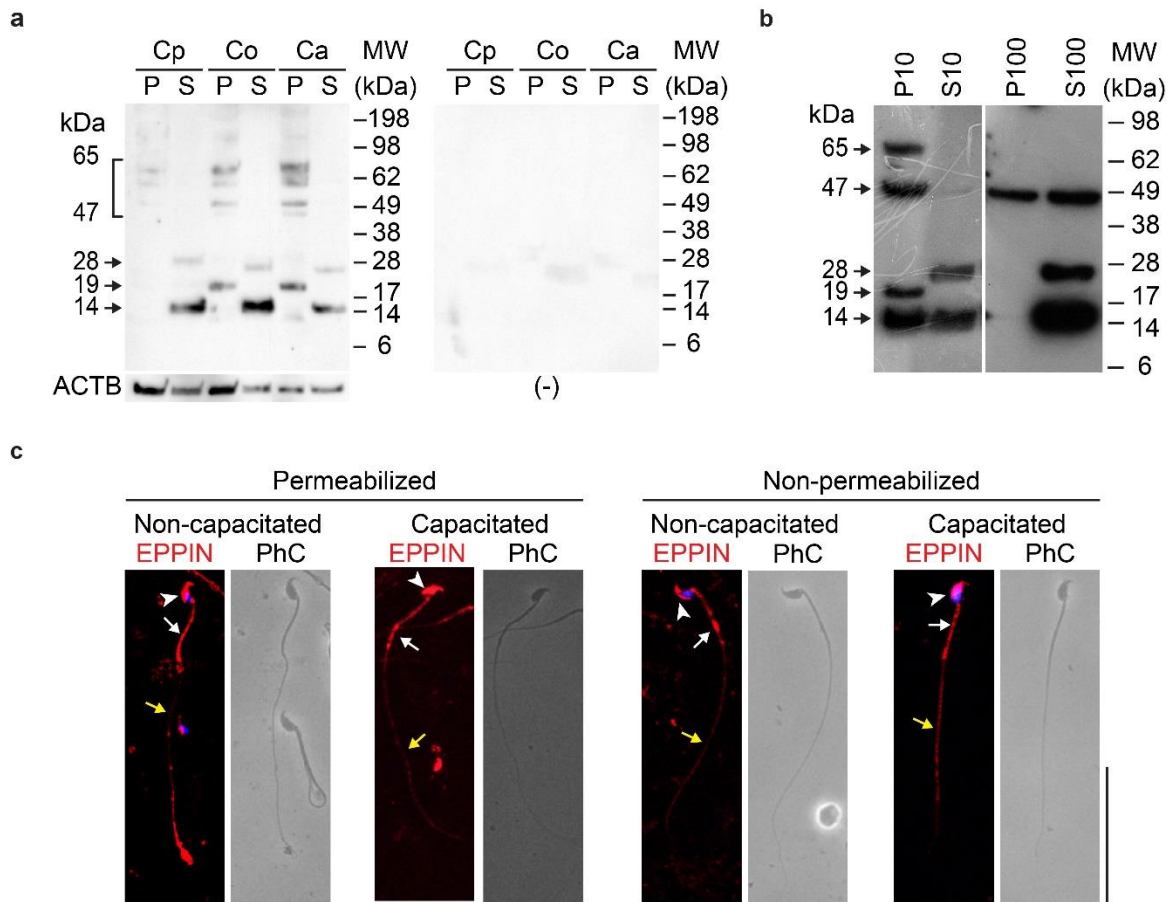


Figure 1. Impact of post-testicular maturation on EPPIN expression in mouse spermatozoa. (a) EPPIN expression in Triton X-100 insoluble (P) and soluble (S) fractions of spermatozoa isolated from caput (including the initial segment, Cp), corpus (Co), and cauda (Ca) epididymidis by Western blot. ACTB was used as an endogenous control. Negative control (-) was performed with primary antibody pre-adsorbed with recombinant EPPIN. **(b)** EPPIN expression in subcellular fractions of spermatozoa isolated from the cauda epididymis. P10 and S10 indicate TE buffer soluble and insoluble fractions, respectively, after centrifugation. P100 and S100 indicate S10 soluble and insoluble fractions after ultracentrifugation. Membranes were probed with Q20E antibody. Arrows indicate EPPIN-positive immunoreactive bands. MW indicates a standard protein ladder (kDa). **(c)** EPPIN-positive immunostaining in non-capacitated and capacitated mouse spermatozoa. Immunofluorescence experiments were performed in the presence or absence of saponin to obtain permeabilized (left panel) and non-permeabilized (right panel) spermatozoa. EPPIN-positive-immunostaining was detected on the head (arrowhead), midpiece (white arrow), and principal piece (yellow arrow) of the flagellum. Cell nuclei were stained with DAPI in blue. Merg: Merged; PhC: Phase contrast. Scale bar: 50 μ m. Results are representative of independent experiments performed with samples from 5 (A) and 3 (B, C) mice.

Next, we evaluated the relative stability of EPPIN in spermatozoa during capacitation. Immunofluorescence assays showed a similar pattern of EPPIN-positive immunostaining in both saponin-permeabilized and non-permeabilized spermatozoa, thus confirming the presence of EPPIN on the sperm surface (Fig. 1c). Most non-capacitated spermatozoa displayed EPPIN-positive immunostaining in the anterior acrosome and equatorial segment of the head (Fig. 1c). We further observed EPPIN-positive staining in the midpiece (greater intensity) and principal piece (lower intensity) of the flagellum of non-capacitated spermatozoa (Fig. 1c). This pattern of

EPPIN-positive immunostaining was similar in capacitated spermatozoa regardless of cell permeabilization with saponin (Fig. 1c). We obtained similar results when saponin-permeabilized and non-permeabilized spermatozoa were stained with anti-EPPIN S21C and F21C antibodies, which map the sequence Phe90-Cys110 and Ser103-Cys123 in the EPPIN C-terminal region, respectively (Table 1, Supplementary Fig. S2 online). No immunostaining was observed in negative controls performed in the absence of primary antibodies (Supplementary Fig. S1 online). These results demonstrated that Q20E, S21C, and F21C epitopes are available for antibody binding on the mouse sperm surface and that EPPIN remains in capacitated spermatozoa.

Antibodies mapping epitopes in EPPIN WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) domains differentially inhibited mouse sperm motility

We investigated the effects of three anti-EPPIN antibodies mapping distinct epitopes in EPPIN C-terminal (containing the Kunitz domain; F21C and S21C antibodies) and N-terminal (containing the WFDC domain; Q20E antibody) regions on mouse sperm motility. For that, we incubated spermatozoa isolated from the cauda epididymis in the presence of pre-immune serum (PIS, control) or the different anti-EPPIN antibodies and evaluated their motility parameters after 30, 60, and 120 min by computer-assisted sperm analysis (CASA).

F21C antibody (0.4 mg/ml) did not affect any motility parameter, except by an increase in progressive motility 60 min ($>31\%$, $p=0.041$) after incubation (Supplementary Fig. S3 online). We observed that S21C antibody (0.4 mg/ml) inhibited motility 60 min ($<25\%$, $p=0.005$) and 120 min ($<25\%$, $p=0.011$) after incubation in comparison to PIS control (Fig. 2a). S21C antibody further inhibited progressive motility, which manifested earlier at 30 min ($<40\%$, $p=0.009$) and persisted until 60 min ($<40\%$, $p=0.003$) after incubation (Fig. 2a). These results were consistent with a readily detectable reduction on the length of sperm tracks in S21C antibody-treated samples in comparison to PIS control (Supplementary Fig. S4 online, Supplementary Videos S1 and S2 online). Moreover, S21C antibody inhibited hyperactivated motility at 120 min ($<85\%$, $p=0.002$) (Fig. 2a). To address whether S21C-induced inhibition of sperm motility was dependent on bivalent or monovalent interaction with its epitope, we incubated mouse spermatozoa with

S21C antibody Fab fragments [S21C(Fab)]. We observed that S21C(Fab) (0.5 mg/ml) inhibited sperm motility (30 min: <29%, $p=0.0002$; 60 min: <43%, $p=0.001$; and 120 min: <57%, $p=0.0001$) and progressive motility (30 min: <55%, $p<0.004$; 60 min: <58%, $p=0.032$; and 120 min: <74%, $p=0.001$) at all time-points analyzed in comparison to control samples incubated with normal rabbit IgG Fab fragments [IgG(Fab)] (Fig. 2b, Supplementary Videos S3 and S4 online). Consistently, S21C(Fab) inhibited hyperactivated motility at 120 min (<71%, $p=0.018$) after incubation (Fig. 2B).

Regarding Q20E antibody (0.4 mg/ml), which maps an epitope in EPPIN N-terminal region, we observed no effect on sperm motility at any time-point analyzed (Supplementary Fig. S5 online). At a higher concentration (0.6 mg/ml), however, Q20E induced milder effects on sperm motility. Thus, we choose 0.6 mg/ml Q20E antibody for further analyzes. Q20E antibody (0.6 mg/ml) did not change sperm motility in comparison to PIS control, except by an inhibition of progressive motility at 30 min (<37%, $p=0.008$) and 60 min (<49%, $p=0.014$) after incubation (Fig. 2c, Supplementary Video S5 online). On the other hand, Q20E Fab fragments [Q20E(Fab), 0.6 mg/ml] inhibited both motility (60 min: <26%, $p=0.023$; and 120 min: <35%, $p=0.005$) and progressive motility (60 min: <38%, $p=0.021$; and 120 min: <41%, $p=0.010$) at 60 min and 120 min after incubation (Fig. 2d, Supplementary Video S6 online). Neither Q20E antibody nor Q20E(Fab) affected hyperactivated motility (Fig. 2c-d).

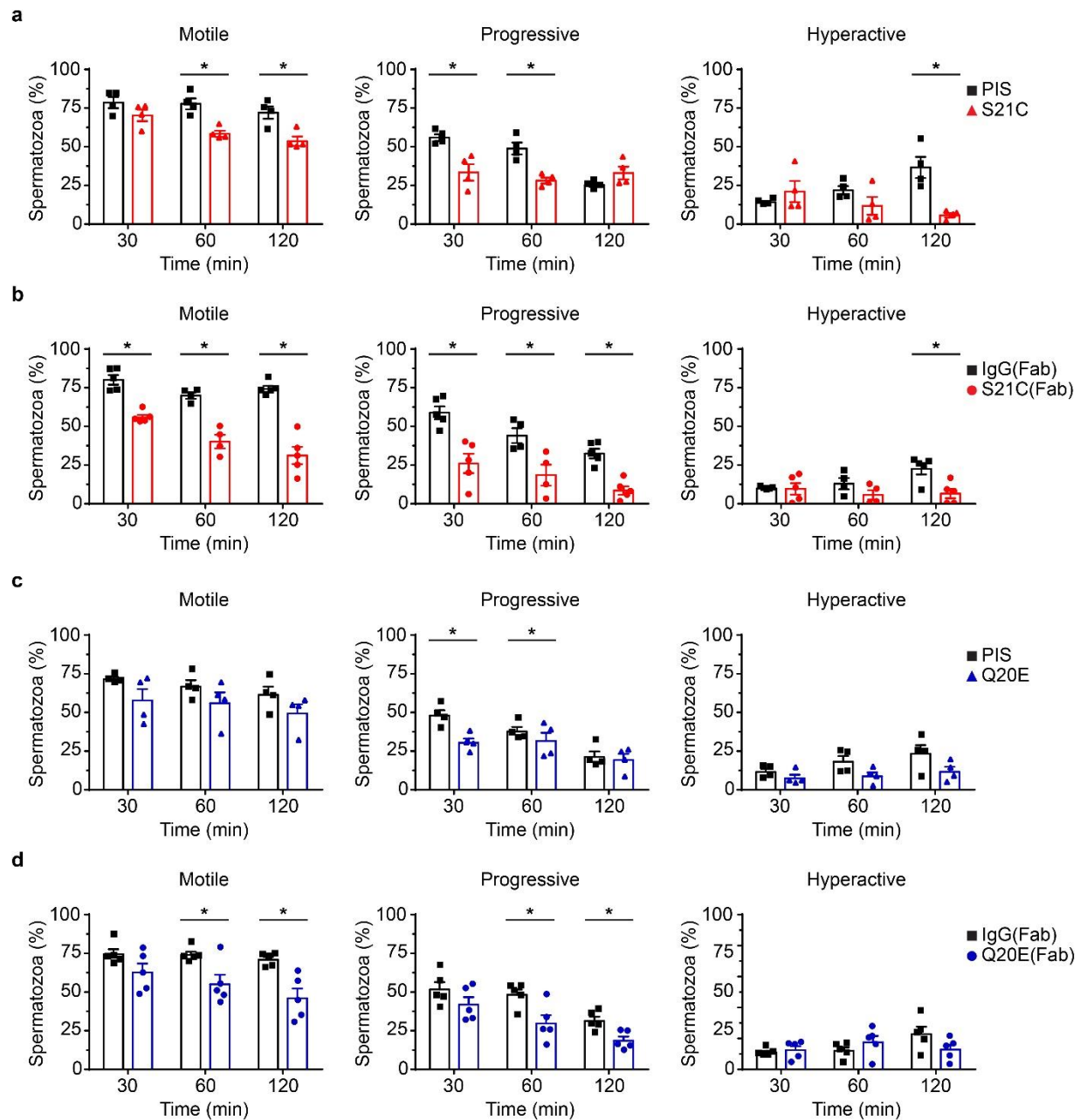


Figure 2. Effects of anti-EPPIN S21C and Q20E antibodies on mouse sperm motility. (a, b) Motility of spermatozoa incubated with S21C antibody (0.4 mg/ml), or its Fab fragment [S21C(Fab), 0.5 mg/ml]. (c, d) Motility of spermatozoa incubated with Q20E antibody (0.6 mg/ml), or its Fab fragment [Q20E(Fab), 0.6 mg/ml]. Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) or normal rabbit IgG Fab fragments [IgG (Fab)] under the same conditions were used as controls. Sperm motility was evaluated 30, 60, and 120 min after incubation. *Indicates statistically different from control groups ($p < 0.05$; Student t-test). Percentage data were converted to arcsine square-root values before statistical analysis. Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 4-5 mice.

Antibodies mapping epitopes in EPPIN WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) domains differentially modulated mouse sperm kinematics parameters

Next, we evaluated the effects of anti-EPPIN antibodies on sperm kinematics parameters driving progressive (VAP, VSL and STR) and vigorous (VCL, ALH and LIN) movements. F21C antibody did not change sperm kinematics parameters, except by an increase in VSL (>31%, $p=0.046$) and STR (>37%, $p=0.045$) at 120 min only (Supplementary Fig. S3 online). Conversely, S21C antibody inhibited VSL at 30 min (<40%, $p=0.016$) and both VSL and VAP at 60 min (VSL: <35%, $p=0.020$, VAP: <28%, $p=0.036$) after incubation (Fig. 3a). S21C-induced inhibition of VAP, but not VSL persisted at 120 min (<26%, $p=0.047$). At this later time-point, S21C antibody further increased STR (>78%, $p=0.002$) (Fig. 3a). Incubation of spermatozoa with S21C(Fab) induced similar outcomes on VAP (60 min: <30%, $p=0.033$; 120 min: <37%, $p=0.003$), VSL (30 min: <35%, $p=0.046$; 60 min: <40%, $p=0.048$, 120 min: <33%, $p=0.048$), but did not affect STR (Fig. 3b).

Kinematics parameters associated with vigorous sperm motility were also affected by S21C antibody, as demonstrated by a decrease in VCL and ALH at 60 min (VCL: <30%, $p=0.039$, ALH: <32%, $p=0.045$) and 120 min (VCL: <26%, $p=0.043$, ALH: <31%, $p=0.045$), in parallel to an increase in LIN at 120 min (>64%, $p=0.001$) after incubation (Fig. 3a). S21C(Fab) induced a similar decrease in ALH at all time-points (30 min: <18%, $p=0.039$; 60 min: <24%, $p=0.033$, 120 min: <37%, $p=0.0002$) and in VCL at 120 min (<38%, $p=0.003$) after incubation (Fig. 3b). However, S21C(Fab) decreased LIN at 30 min (<21%, $p=0.048$) after incubation but not at later time-points (Fig. 3b).

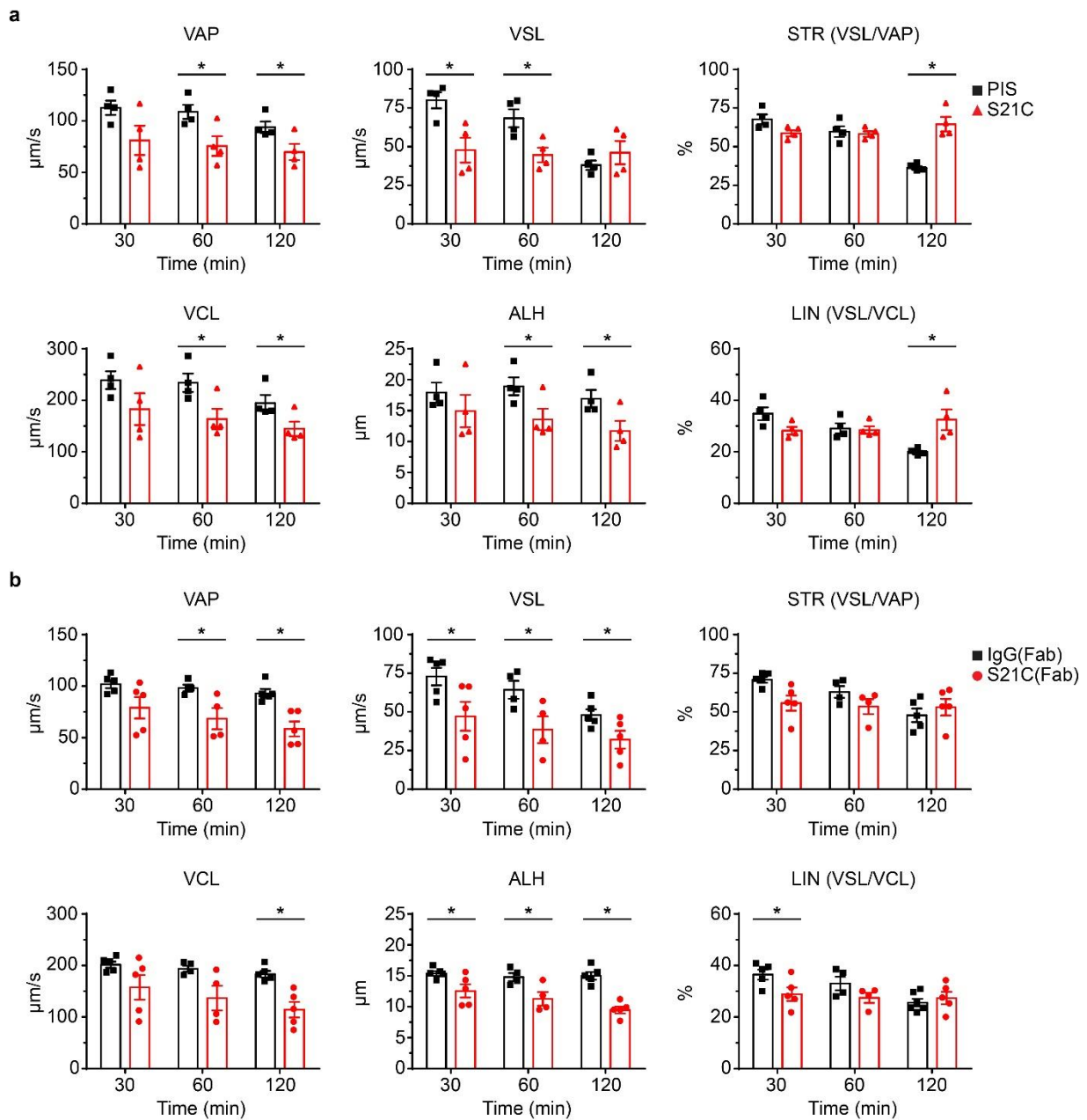


Figure 3. Effects of anti-EPPIN S21C antibody on mouse sperm kinematics parameters. (a) Kinematics parameters of spermatozoa incubated with S21C antibody (0.4 mg/ml). **(b)** Kinematics parameters of spermatozoa incubated with S21C Fab fragment [S21C(Fab)] (0.5 mg/ml). Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) or normal rabbit IgG Fab fragments [IgG (Fab)] under the same conditions were used as controls. Kinematics parameters were evaluated 30, 60, and 120 min after incubation. VAP: average path velocity, VSL: straight-line velocity, STR: straightness, VCL: curvilinear velocity, ALH: amplitude of lateral head displacement, and LIN: linearity. *Indicates statistically different from control groups ($p < 0.05$; Student t-test). Percentage data were converted to arcsine square-root values before statistical analysis. Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 4-5 mice.

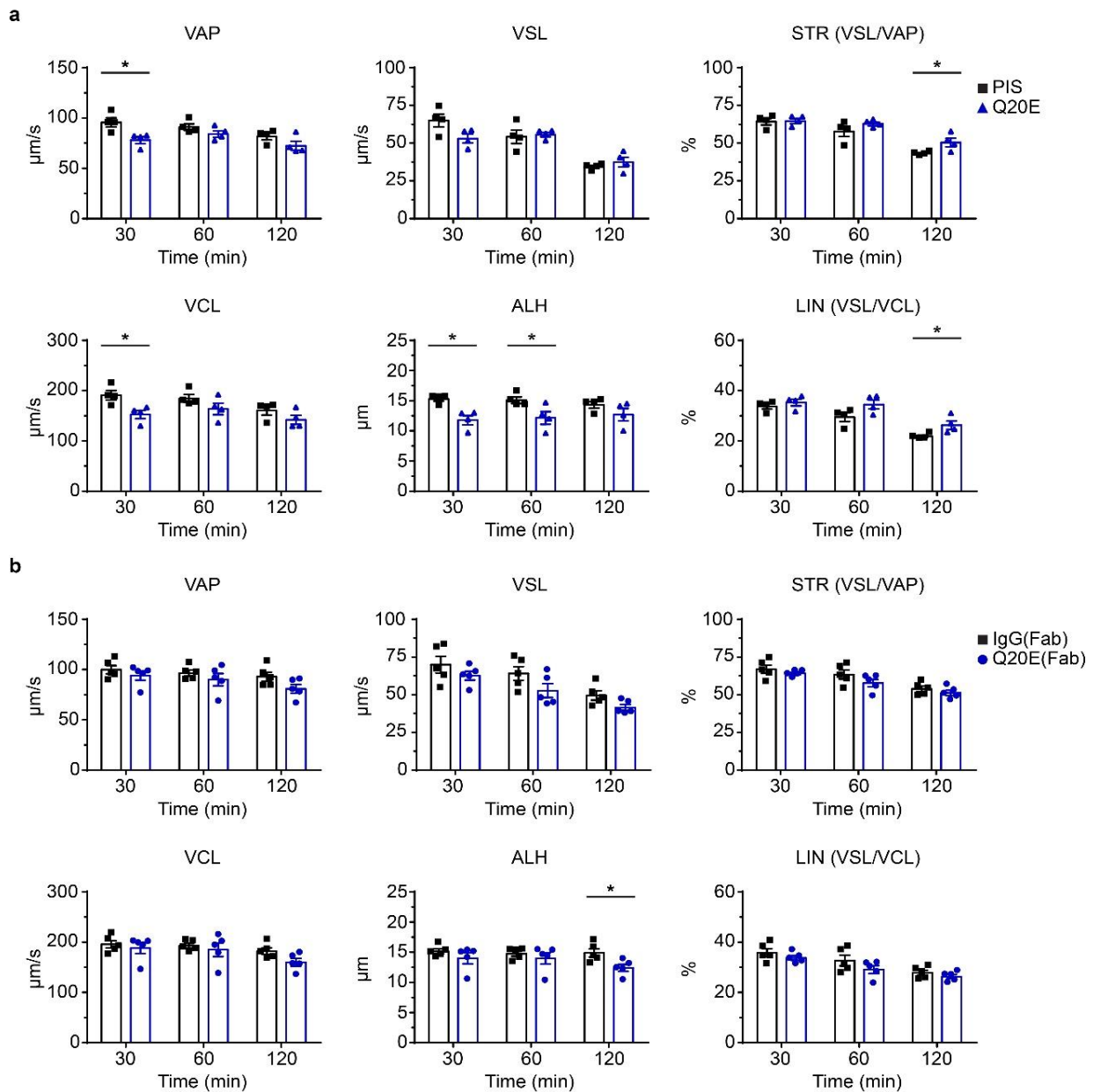


Figure 4. Effects of anti-EPPIN Q20E antibody on mouse sperm kinematics parameters. (a) Kinematics parameters of spermatozoa incubated with Q20E antibody (0.6 mg/ml). (b) Kinematics parameters of spermatozoa incubated with Q20E Fab fragment [Q20E(Fab)] (0.6 mg/ml). Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) or normal rabbit IgG Fab fragments [IgG(Fab)] under the same conditions were used as controls. Kinematics parameters were evaluated 30, 60, and 120 min after incubation. VAP: average path velocity, VSL: straight-line velocity, STR: straightness, VCL: curvilinear velocity, ALH: amplitude of lateral head displacement, and LIN: linearity. *Indicates statistically different from control groups ($p < 0.05$; Student t-test). Percentage data were converted arcsine square-root values before statistical analysis. Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 4-5 mice.

Consistent with the effects induced in sperm progressive motility, Q20E antibody decreased VAP ($<19\%$, $p=0.022$) and increased STR ($>17\%$, $p=0.044$) at 30 min and 120 min after incubation, respectively (Fig. 4a). We further observed that Q20E antibody decreased VCL at 30

min ($<20\%$, $p=0.022$) and ALH at 30 min ($<23\%$, $p=0.006$) and 60 min ($<19\%$, $p=0.048$) after incubation (Fig. 4a). Moreover, Q20E antibody induced a later increase in LIN at 120 min ($>20\%$, $p=0.044$) (Fig. 4a). Q20E(Fab), however, did not reproduce the effects of Q20E antibody on sperm kinematics parameters; we did not observe any effect of Q20E(Fab), except a decrease in ALH ($<17\%$, $p=0.026$) at 120 min after incubation (Fig. 4b).

The negative impact of S21C antibody on sperm motility and kinematic parameters caused a ~2-fold decrease in the normalized index of relative motility inhibition (RMI), which correlates sperm motility and VSL¹⁰, at 30 min ($p=0.037$) and 60 min ($p=0.001$) (Fig. 5a). Moreover, S21C antibody induced a ~2-fold decrease in the normalized DANCE, which correlates VCL and ALH²⁵ at 60 min ($p=0.001$) and 120 min ($p=0.003$) (Fig. 5a). We obtained similar results when spermatozoa were incubated with S21C(Fab), which decreased normalized RMI at all time-points (30 min: <2 -fold, $p=0.012$, 60 min: <3 -fold, $p=0.009$, and 120 min: <5 -fold, $p<0.0001$) and normalized DANCE at 60 min (<2 -fold, $p=0.037$) and 120 min (<3 -fold, $p=0.003$) (Fig. 5b). Regarding Q20E antibody, we observed no effects on normalized RMI, while normalized DANCE was decreased 30 min (<1.6 -fold, $p=0.011$) after incubation, an effect that did not persist at later time-points (Fig. 5c). On the other hand, Q20E(Fab) induced a decreased in normalized RMI (<1.7 -fold, $p=0.004$) and normalized DANCE (1.4-fold, $p<0.0009$) at 120 min after incubation (Fig. 5d).

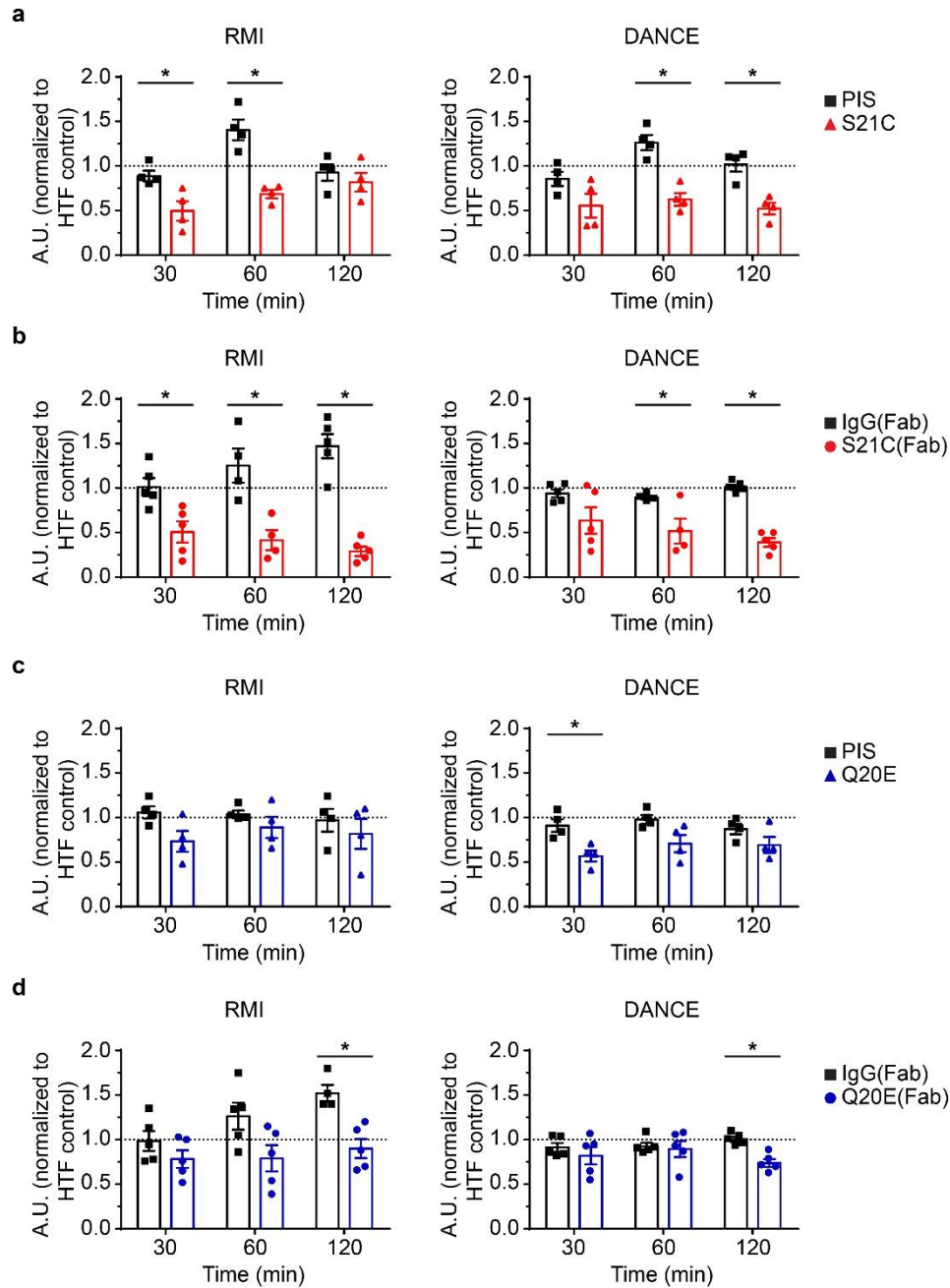


Figure 5. Effects of anti-EPPIN S21C and Q20E antibodies on motility indexes measuring progressive (RMI) and vigorous (DANCE) movements in mouse spermatozoa. (a, b) Normalized RMI and normalized DANCE of spermatozoa incubated with S21C antibody (0.4 mg/ml), or its Fab fragment [S21C(Fab), 0.5 mg/ml]. **(c,d)** Normalized RMI and normalized DANCE of spermatozoa incubated with Q20E antibody (0.6 mg/ml), or its Fab fragment [Q20E(Fab), 0.6 mg/ml]. Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) or normal rabbit IgG Fab fragments [IgG(Fab)] under the same conditions were used as controls. Normalized RMI and normalized DANCE were calculated using sperm motility data acquired 30, 60, and 120 min after incubation. Normalized RMI was calculated as (%motility*VSL of sample/%motility*VSL of control). Normalized DANCE was calculated as (VCL*ALH of sample/VCL*ALH of control). *Indicates statistically different from PIS group ($p < 0.05$; Student t-test). Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 4-5 mice.

Discussion

Pharmacological approaches targeting EPPIN have the potential to generate a novel class of on-demand, fast-onset, non-hormonal male contraceptive drugs with sperm motility inhibitory activity^{1,2}. Previous studies have established that the EPPIN C-terminal region, containing the Kunitz domain, provides a binding surface for SEMG1 on human spermatozoa, resulting in transient inhibition of progressive motility after ejaculation^{7,19,1}. For this reason, studies on EPPIN ligands as sperm motility inhibitors are based on compounds that bind to the EPPIN Kunitz domain^{18,1,20}. Nevertheless, recent studies on full-length EPPIN homology models indicated that amino acid residues in both WFDC and Kunitz domains may play roles in EPPIN interaction with SEMG1 and its small molecular weight ligand EP055, suggesting that EPPIN N-terminal and C-terminal regions could contribute to the regulation of sperm motility²¹. Using anti-EPPIN antibodies as pharmacological tools, we showed that the EPPIN Kunitz domain plays a major role in governing progressive and vigorous movements of mouse spermatozoa, but its WFDC domain may also contribute to these outcomes. Our study sheds new light on the understanding of relative contributions of EPPIN WFDC and Kunitz domains on the regulation of sperm motility, which may contribute to the rational design of EPPIN-binding drugs.

Our previous studies in rats and mice showed that EPPIN localization in spermatozoa dynamically changes during epididymal maturation, becoming more abundant in the head and flagellum of spermatozoa isolated from distal regions of the epididymis (corpus and cauda)^{19,6}. Our results herein support these observations, as we detected EPPIN-positive bands in the Triton X-100 insoluble and soluble fraction from spermatozoa isolated from the corpus and cauda epididymidis, but not from the caput region. Moreover, EPPIN-positive immunoreactive bands were differentially associated with cellular fractions of mouse spermatozoa, suggesting EPPIN may be involved in different events governing sperm function. The ~19 kDa band was restricted to the Triton X-100 insoluble fraction from mature spermatozoa, indicating its association with sperm cytoskeleton and flagellar accessory structures²⁴. In parallel, we detected EPPIN as a monomer (~14 kDa band) and dimers (~28 kDa band) in the Triton X-100 soluble fraction regardless of sperm maturation stage.

Interestingly, the ~14 kDa and ~28 kDa bands were also present in TE buffer-soluble fraction (S10), suggesting they are soluble proteins and/or associated with the plasma membrane. To further investigate this possibility, we performed cell fractionation of the S10 fraction from spermatozoa isolated from the cauda epididymis by ultracentrifugation²⁴. The presence of ~14 kDa and ~28 kDa bands in the S100 fraction indicated that EPPIN monomers and dimers are either soluble or loosely bound to sperm membranes. Intriguingly, we detected the ~47 kDa EPPIN-positive immunoreactive band, which likely represents EPPIN oligomers, in the sperm membrane-enriched fraction (P100), even in the presence of reducing agents. Consistently, we detected EPPIN-immunopositive staining in non-permeabilized spermatozoa. These findings show that epididymal maturation but not capacitation influence EPPIN association with different cellular compartments of mouse spermatozoa. It is worth noting, however, that how EPPIN is directed to the membrane remains unknown. The nature of the compartmentalized expression of EPPIN in spermatozoa and its impact on sperm function warrants further investigation.

Acquisition of sperm motility is an essential event for mammalian reproduction²⁴. In the clinical scenario, poor sperm motility is a relevant cause of male infertility, which can only be defeated by assisted reproductive techniques²⁶. On the other hand, targeting the mechanisms governing sperm motility offers excellent opportunities for the development of first-in-class male contraceptives based on loss of sperm function. EPPIN's pivotal role in regulating sperm motility and EPPIN's druggable properties became milestones for its development as a male contraceptive drug target^{1,20}. In an immunocontraception study, O'Rand *et al*, 2004 demonstrated that active immunization with human recombinant EPPIN in monkeys resulted in reversible infertility due to anti-EPPIN antibodies-induced inhibition of sperm motility. Further analyses on monkey anti-EPPIN contraceptive antibodies led to the identification of two dominant epitopes: Gln20-Arg32 and Thr102-Gln118, which are part of EPPIN WFDC and Kunitz domains, respectively²⁷. Anti-EPPIN antibodies targeting the C-terminal epitope inhibited SEMG1 binding and human sperm motility^{27,28}. Whether EPPIN N-terminal region is involved in these events is still poorly understood.

To gain new insights into the contributions of EPPIN WFDC and Kunitz domains on the regulation of sperm motility, we investigated the effects of three affinity-purified anti-EPPIN

antibodies targeting sequences in N-terminal (Q20E) and C-terminal (S21C and F21C) contraceptive epitopes in mouse spermatozoa. It is worth noting that EPPIN epitopes recognized by Q20E, S21C, and F21C antibodies are exposed on the sperm surface since our immunofluorescence experiments showed intense EPPIN-positive immunostaining in the head and flagellum of non-permeabilized spermatozoa. Our results showed that S21C antibody, but not F21C antibody, negatively affected mouse sperm motility and kinematics parameters, confirming the critical roles of the Kunitz domain for the regulation of sperm motility. Given the differential effects of S21C and F21C antibodies on sperm motility and the partial overlap of their epitopes, we hypothesized that the sequence Gln111-Asn122 contains the residues critical for EPPIN control of sperm motility. This hypothesis is supported by: (i) active immunization of male mice targeting EPPIN Asn113-Asn122 peptide sequence resulted in inhibition of sperm motility and subfertility^{29,30}, (ii) EPPIN residues Asn114 and Asn116 form hydrogen bonds with both SEMG1 and the EPPIN ligands B4 and EP055, which possess sperm motility inhibitory activity^{1,21}, and (iii) EPPIN sequence Gln111-Asn122 is highly conserved among primates and rodents (Supplementary Fig. S6 online).

The proper regulation of progressive motility acquisition and its transition to hyperactivated motility is crucial for sperm fertilization potential³¹. Our results showed that the S21C antibody inhibited both progressive and hyperactivated motility, indicating that it affects signaling pathways governing these motility patterns. These effects were consistent with S21C-induced changes in kinematics parameters associated with progressive (VAP, VSL, and STR) and vigorous (VCL, ALH, and LIN) sperm movements. Interestingly, S21C Fab fragments reproduced these outcomes, indicating that monovalent binding to its epitope is sufficient to affect sperm progressive motility and hyperactivated motility. In human spermatozoa, the S21C antibody and its Fab fragment caused progressive and vigorous motility loss via acidification of intracellular pH and subsequent decrease in intracellular calcium level^{27,6}. Blocking the S21C epitope likely induces a similar disruption of signaling pathways regulating intracellular calcium levels in mouse spermatozoa, impairing both progressive and hyperactivated motility. Future experiments will be necessary to unravel the underlying molecular mechanisms by which EPPIN controls different sperm motility patterns.

Molecular docking studies suggested that SEMG1 and EP055 interact with EPPIN residue Arg32 within the Q20E antibody epitope²¹. In agreement with these observations, we observed a mild effect of the Q20E antibody and its Fab fragment on progressive motility, indicating that the sequence Gln20-Glu39 in the EPPIN WFDC domain may also be involved in the effects of EPPIN ligands on sperm motility. It is worth noting that full-length EPPIN homology modeling showed that residues in the Q20E epitope (e.g., Pro30, Arg31, and Arg32) form intramolecular interactions with residues in the S21C epitope (e.g., Asn113, Asn114, and Asn116)²¹. Thus, we hypothesized that blocking the Q20E epitope disrupts the stability and folding of the Kunitz domain, thus indirectly affecting sperm motility parameters by affecting the folding and stability of the EPPIN monomer and possibly dimer. Additional experiments will be required to determine whether the EPPIN WFDC domain acts as an intramolecular chaperone keeping the proper conformation of the Kunitz domain.

Taken together, we show that both WFDC and Kunitz domains of EPPIN play different roles in the control of mouse sperm progressive and hyperactivated motility. Although the EPPIN Kunitz domain possesses residues critically involved in the regulation of sperm motility, at least some residues in its WFDC domain may facilitate this function. Thus, our results further underscore that rational drug design of EPPIN ligands with potential contraceptive effect should consider their ability to interact with residues in both domains. Moreover, our results provide novel evidence on the functional conservation between human and mouse EPPIN as a key sperm-binding molecule regulating sperm motility.

Materials and methods

Reagents and chemicals

Reagents were molecular biology grade purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA). HTF (human tubal fluid) medium (cat. #90125) was purchased from Irvine Scientific (Santa Ana, CA, USA). Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA).

Animals

We used C57BL/6 male mice (90-120 days old), purchased from Anilab Laboratory (Paulinia/SP). We housed the animals under controlled conditions (12 h light/dark cycle, 22–24°C), with food and water *ad libitum*. We performed all animal experiments in compliance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines, the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, USA), and the National Council of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil) guidelines for animal care and use of laboratory animal. Animal procedures were approved by the Research Committee in the Use of Animals (CEUA), IBB/UNESP (processes #1049 and #1138).

Anti-EPPIN antibodies

Affinity purified rabbit polyclonal anti-EPPIN antibodies mapping N-terminal and C-terminal sequences of EPPIN used in our analyses (Table 1). Anti-EPPIN S21C and F21C antibodies to the C-terminal of human EPPIN were kindly provided by Dr. Michael G. O'Rand, the University of North Carolina at Chapel Hill (UNC), USA. Anti-EPPIN Q20E polyclonal antibody to the N-terminal of murine EPPIN was produced by GenScript Inc. (USA). S21C and Q20E Fab fragments were produced by incubating their respective IgGs with papain using standard protocols (RheaBiotech, Brazil). We dialyzed anti-EPPIN antibodies against sperm culture media before all experiments.

Isolation of mouse epididymal spermatozoa

We collected spermatozoa from mouse caput (including the initial segment), corpus, and cauda epididymidis. We euthanized the animals by cervical dislocation and dissected their epididymides. We transferred epididymal regions to 12-well culture plates containing pre-warmed HTF or TYH (100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 0.8 mM pyruvic acid, 1.7 mM CaCl₂ and 20 mM HEPES, pH 7.2-7.4) medium. Each epididymal region was cut with scissors and incubated at 37°C for 10 min in a controlled atmosphere (5%/95% CO₂/air) to release spermatozoa to the medium. Next, we removed the tissues from the plate well and then performed the sperm count in a Neubauer chamber. For sperm capacitation, we incubated cauda epididymal spermatozoa in TYH medium supplemented with

25 mM NaHCO₃ and 0.75% bovine serum albumin (BSA; fat-free and IgG-free) for 2 h at 37°C and 5%/95% CO₂/air. Spermatozoa were immediately processed for Western blot, immunofluorescence, and motility analysis.

Preparation of sperm soluble and insoluble protein fractions

Triton X-100 soluble and insoluble sperm protein fractions were obtained as previously described²⁴ with few modifications. Briefly, we centrifuged aliquots of sperm suspension from each epididymal region (1.5-5.0 x 10⁶ cells) at 800 x g (5 min) and washed the cell pellet with phosphate buffer (100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2). Spermatozoa were resuspended in TET buffer [1% Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5] containing protease inhibitor cocktail (Sigma, cat. #P8340), and homogenized using a Dounce homogenizer. After incubation on ice for 20 min, samples were centrifuged at 10,000 x g, (4°C, 15 min), and the following cellular fractions were obtained: fraction S (supernatant), containing soluble, partly soluble proteins and membranes; fraction P (pellet), containing nucleus, mitochondria and accessory structures of the flagellum.

Cell fractionation

We obtained subcellular fractions of spermatozoa from the cauda epididymidis as previously described²⁴. Briefly, spermatozoa were homogenized in TE buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) containing protease inhibitor cocktail. After centrifugation at 10,000 x g (4°C, 10 min), the resulting supernatant (S10 fraction) was centrifuged at 100,000 x g (4°C, 60 min). We obtained the following fractions: (i) P10, the pellet of the 10,000 x g centrifugation containing organelles such as nuclei, mitochondria, and accessory structures of the flagellum, (ii) P100, the pellet of the 100,000 x g centrifugation containing mostly membranes, and (iii) S100 the supernatant of the 100,000 x g centrifugation containing soluble proteins.

Western blot analysis

We resuspended the pellet and supernatant fractions previously obtained in sample buffer supplemented or not with 50 mM TCEP [tris(2-carboxyethyl) phosphine] and size-separated by SDS-PAGE as previously described⁶. Proteins were transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and protein transfer was verified by Amido Black staining.

Membranes were incubated with blocking solution [5% milk (m/v) in TBS-T buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (v/v))] for 1.5 h, washed with TBS-T buffer, then sequentially probed with anti-EPPIN Q20E antibody (1.5 µg/ml) and anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (0.01 µg/ml). Protein detection was obtained by chemiluminescence with ECL Super Signal West Femto (Thermo Fisher). Negative control experiments were performed in the presence of anti-EPPIN antibody pre-adsorbed with a 10-fold molar excess of recombinant EPPIN. Anti-ACTB (actin beta) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling, cat. #4970S, 1:1000) was used as an endogen control.

Immunofluorescence

We performed immunofluorescence assays using spermatozoa isolated from cauda epididymidis submitted or not to capacitation. Experiments were performed using buffers supplemented or not with 0.02% saponin (m/v) to obtain permeabilized and non-permeabilized cells, respectively³². Briefly, paraformaldehyde-fixed air-dried sperm smears were incubated with blocking buffer [1% BSA (m/v) in PBS buffer] for 90 min. Smears were then incubated with one of the following anti-EPPIN antibodies: S21C (1.5 µg/ml), F21C (2.0 µg/ml), or Q20E (5 µg/ml) diluted in blocking buffer overnight at 4°C. Smears were washed and incubated with Alexa Fluor 594 conjugated anti-rabbit secondary antibody (10 µg/ml) for 60 min. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was used for nuclear identification. Images were captured and documented with a digital photomicroscope Axiophot II (Zeiss Jena) using appropriate excitation filters. The final pictures were chosen to represent the pattern of EPPIN-positive staining routinely observed in immunofluorescence experiments and subjected to the same brightness/contrast adjustments using Image J software³³.

Analysis of Sperm Motility

We diluted sperm suspension (2×10^5 cells/ml) with HTF medium containing anti-EPPIN S21C, F21C or Q20E antibodies or their respective Fab fragments (0.4-0.6 mg/ml) in 12- X 75-mm glass tubes at 37°C and 5%/95% CO₂/air. Sperm suspensions were incubated in the absence of anti-EPPIN antibodies (HTF only), and in the presence of pre-immune serum (PIS) or normal rabbit IgG Fab fragments (0.4-0.6 mg/ml) were used as controls.

We evaluated sperm motility by computer-assisted sperm analysis (CASA) using a CEROS II system (Hamilton-Thorne), including Animal Motility-II Software version 1.9, and an Olympus CX41 microscope equipped with a MiniTherm stage warmer and a JAI CM-040 digital camera. We placed aliquots of diluted sperm suspension into pre-warmed 80-µm 2XCELL slides (Hamilton-Thorne) at 37°C using large-bore pipette tips. We evaluated sperm motility 30, 60, and 120 min after incubation. Time-point zero was considered 3 min after incubation of spermatozoa with anti-EPPIN antibodies. Sperm tracks (1.5 s, 90 frames) were captured with a frame rate acquisition of 60 Hz and 4x negative-phase contrast objective. We recorded at least 200 spermatozoa, and 10 fields for each sample analyzed. We used the video playback to analyze sperm tracks individually and remove mistracked spermatozoa, which may occur due to cell-cell or cell-debris collisions and false-negative debris detection. We retrieved individual ASCII files containing individual sperm track details for every analysis made. Sperm tracks with less than 45 (50%) acquisition points were removed from subsequent analyses³⁴.

We evaluated the following sperm kinematic parameters: average path velocity (VAP; µm/s), straight-line velocity (VSL; µm/s), curvilinear velocity (VCL; µm/s), the amplitude of lateral head (ALH; µm), straightness (STR, %) and linearity (LIN; %). We classified tracks as progressive if $VAP > 50 \mu\text{m/s}$ and $STR > 50\%$, and as hyperactivated if $VCL \geq 180 \mu\text{m/s}$, $ALH \geq 9.5 \mu\text{m}$, and $LIN < 23.6\%$ ³⁵. The percentage sperm motility (%motility) and straight-line velocity were used to calculate the normalized index of relative motility inhibition (RMI, $\%motility \cdot VSL$ of sample/ $\%motility \cdot VSL$ of control)¹⁰. The amplitude of lateral head and curvilinear velocity were used to calculate the normalized DANCE ($VCL \cdot ALH$ of sample/ $VCL \cdot ALH$ of control)²⁵.

Statistical Analysis

We expressed the results as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). We checked the normal distribution and homoscedasticity of the data using the Kolmogorov–Smirnov test and the F-test, respectively. Data that failed Kolmogorov–Smirnov test or F-test were transformed to Log values before parametric statistics. Percentage data were transformed to arcsine square-root transformation before statistical analysis³⁶. Student's t-test was performed to determine statistical differences between two groups. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test was used to determine statistical differences when more than two groups were compared. $P < 0.05$ was considered statistically significant. We performed statistical analyses using GraphPad Prism® 6.0 software (GraphPad Software Inc.).

Data availability

All data generated during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

Table 1. Information about antibodies used in our experiments.

Anti-EPPIN antibody	Epitope sequence	Region/domain	NCBI accession number
S21C	¹⁰³ SMFVYGGCQGNNNNFQSKANC ¹²³	C-terminal/Kunitz	NP_065131
F21C	⁹⁰ FLHWWYDKKDNTCSMFVYGGC ¹¹⁰	C-terminal/Kunitz	NP_065131
Q20E	²⁰ QGPSLADLLFPRRCPRFREE ³⁹	N-terminal/WFDC	NP_083601

References

1. 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.* **157**, 105–111 (2016).
2. Drevet, J. R. Epididymal approaches to male contraception. *Basic Clin. Androl.* **28**, 12 (2018).
3. Long, J. E., Lee, M. S. & Blithe, D. L. Male Contraceptive Development: Update on Novel Hormonal and Nonhormonal Methods. *Clin. Chem.* **65**, 153–160 (2019).
4. Richardson, R. T. *et al.* Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene* **270**, 93–102 (2001).
5. Robertson, M. J. *et al.* Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets. *BMC Biology* **18**, 103 (2020).
6. Mariani, N. A. P. *et al.* Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology* **506**, 110754 (2020).
7. Wang, Z., Widgren, E. E., Sivashanmugam, P., O'Rand, M. G. & Richardson, R. T. Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **72**, 1064–1070 (2005).
8. 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.* **77**, 476–484 (2007).
9. Mitra, A., Richardson, R. T. & O'Rand, M. G. Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biol. Reprod.* **82**, 489–496 (2010).
10. 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* **8**, e82014 (2013).
11. de Lamirande, E., Yoshida, K., Yoshiike, T. M., Iwamoto, T. & Gagnon, C. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J. Androl.* **22**, 672–679 (2001).
12. de Lamirande, E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost* **33**, 60–68 (2007).
13. Kawano, N. & Yoshida, M. Semen-Coagulating Protein, SVS2, in Mouse Seminal Plasma Controls Sperm Fertility. *Biol Reprod* **76**, 353–361 (2007).
14. de Lamirande, E. & Lamothe, G. Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. *Hum Reprod* **25**, 1619–1630 (2010).
15. Sakaguchi, D. *et al.* Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
16. Ding, X. *et al.* Variants of the EPPIN gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. *Hum. Reprod.* **25**, 1657–1665 (2010).
17. Bourgeon, F. *et al.* Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biol Reprod* **70**, 768–774 (2004).

18. O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Hamil, K. G., Silva, E. J. & Richardson, R. T. Epididymal protein targets: a brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. *J. Androl.* **32**, 698–704 (2011).
19. 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* **87**, (2012).
20. O'Rand, M. G., Hamil, K. G., Adevai, T. & Zelinski, M. Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. *PLoS ONE* **13**, e0195953 (2018).
21. Shan, C. *et al.* Binding interactions of epididymal protease inhibitor and semenogelin-1: a homology modeling, docking and molecular dynamics simulation study. *PeerJ* **7**, e7329 (2019).
22. McCrudden, M. T. C., Dafforn, T. R., Houston, D. F., Turkington, P. T. & Timson, D. J. Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. *FEBS J.* **275**, 1742–1750 (2008).
23. Yenugu, S. *et al.* Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biol. Reprod.* **71**, 1484–1490 (2004).
24. Visconti, P. E. *et al.* Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 82–93 (1996).
25. Alquézar-Baeta, C. *et al.* OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLOS Computational Biology* **15**, e1006691 (2019).
26. Turner, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**, 25–38 (2006).
27. 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* **80**, 279–285 (2009).
28. O'Rand, M. G. & Widgren, E. E. Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. *Biol. Reprod.* **86**, 55 (2012).
29. Bian, Z.-H. *et al.* Localization of epididymal protease inhibitor in adult rat and its transcription profile in testis during postnatal development. *Asian J. Androl.* **11**, 731–739 (2009).
30. Sun, L.-L. *et al.* Screening and identification of dominant functional fragments of human epididymal protease inhibitor. *Vaccine* **28**, 1847–1853 (2010).
31. Suarez, S. S. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* **14**, 647–657 (2008).
32. Jamur, M. C. & Oliver, C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol. Biol.* **588**, 63–66 (2010).
33. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682 (2012).
34. Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W. & O'Brien, D. A. Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model. *Biology of Reproduction* **84**, 1207–1215 (2011).
35. Ernesto, J. I. *et al.* CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol* **210**, 1213–1224 (2015).

36. Zar, J. H. *Biostatistical Analysis (5th Edition)*. (Prentice-Hall, Inc., 2007).

Acknowledgments: The authors are grateful to Luiz Antonio de Oliveira and Paulo Cesar Mioni for their technical assistance, Prof. Luiz Claudio Di Stasi, PhD, Prof. Rafael Henrique Nobrega, PhD and Fernanda Franchi, PhD for their help in immunofluorescence experiments, and Alexandre D. Andrade, MSc, and Joel Gabrili, MSc for their assistance in animal experiments and cell fractionation experiments. The authors also thank Prof. Pablo Visconti for providing the protocols for cell fractionation and Prof. Michael O'Rand and Katherine Hamil, M.Sc. for reading the manuscript.

Author's roles

E.J.R.S conceived, designed the research, and prepared the figures. A.A.S.S., N.A.P.M., and H.K. performed the experiments. M.C.W.A. contributed to experimental design and data analysis. E.J.R.S. and A.A.S.S. performed data analysis and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL**Differential effects of antibodies mapping EPPIN N-terminal and C-terminal sequences on the regulation of mouse sperm motility**

Alan Andrew S. Silva¹, Tamiris R. F. Raimundo¹, Noemia Aparecida P. Mariani¹, Hélio Kushima¹, Maria Christina W. Avellar² and Erick J. R. Silva^{1*}.

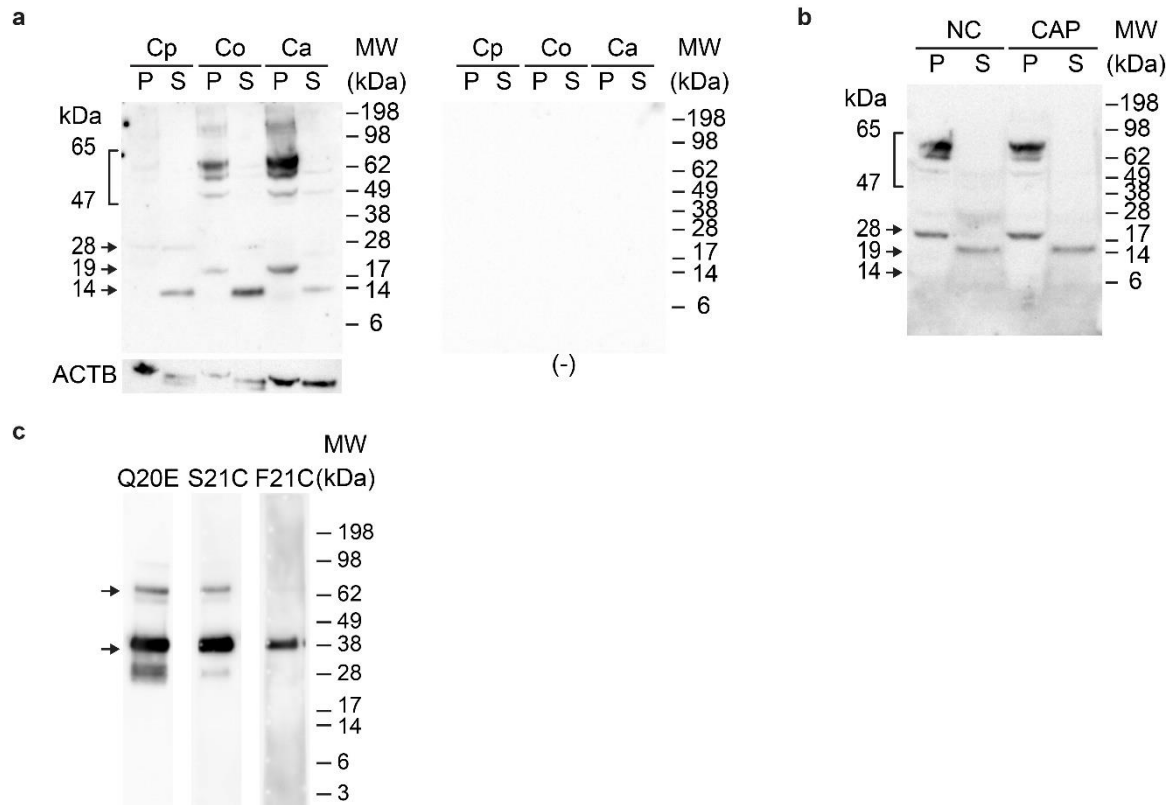
Affiliations:

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

²Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo—Escola Paulista de Medicina, São Paulo-SP, Brazil.

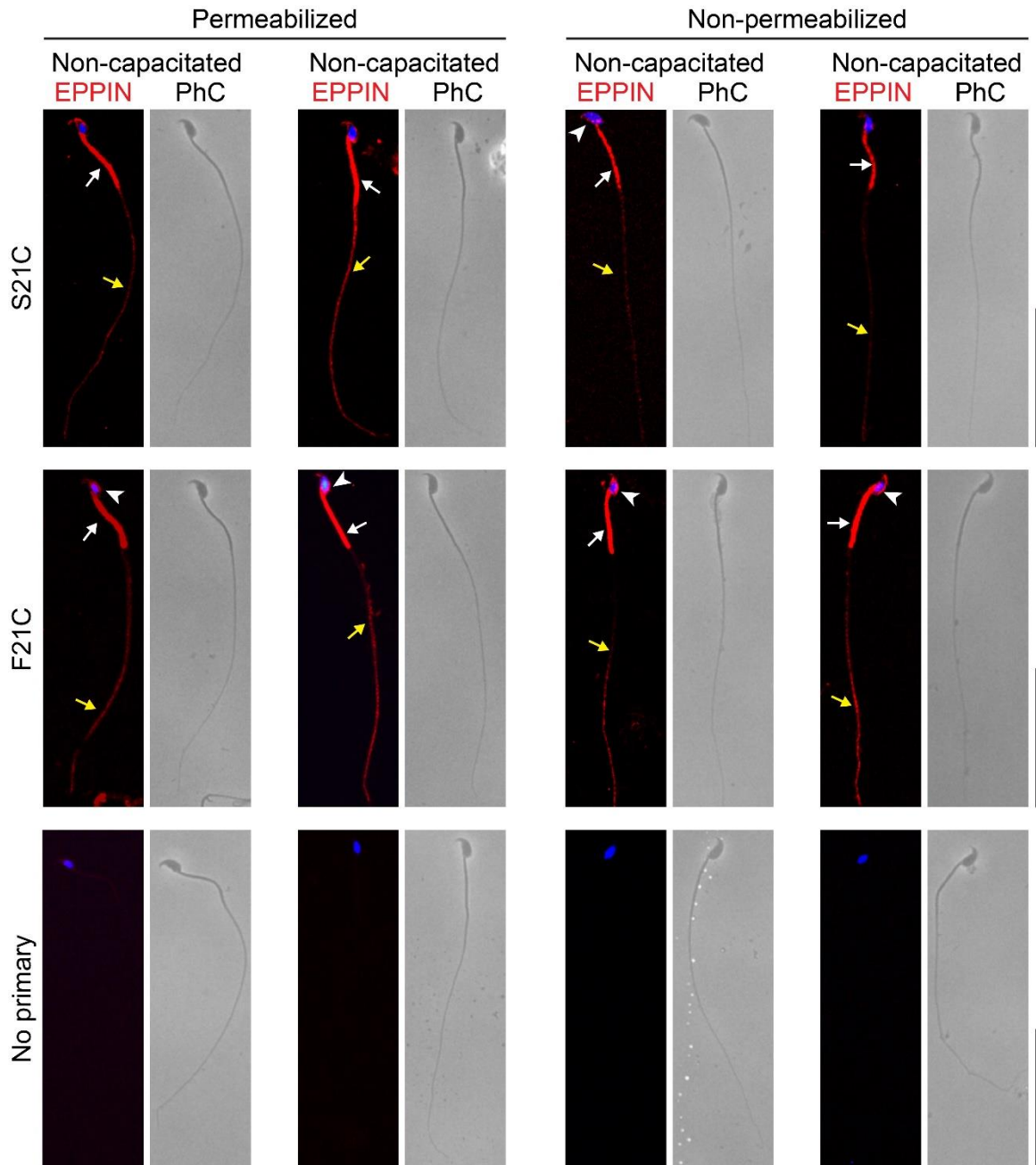
*Corresponding author: E.J.R. Silva, ejr.silva@unesp.br

Supplementary Figure 1



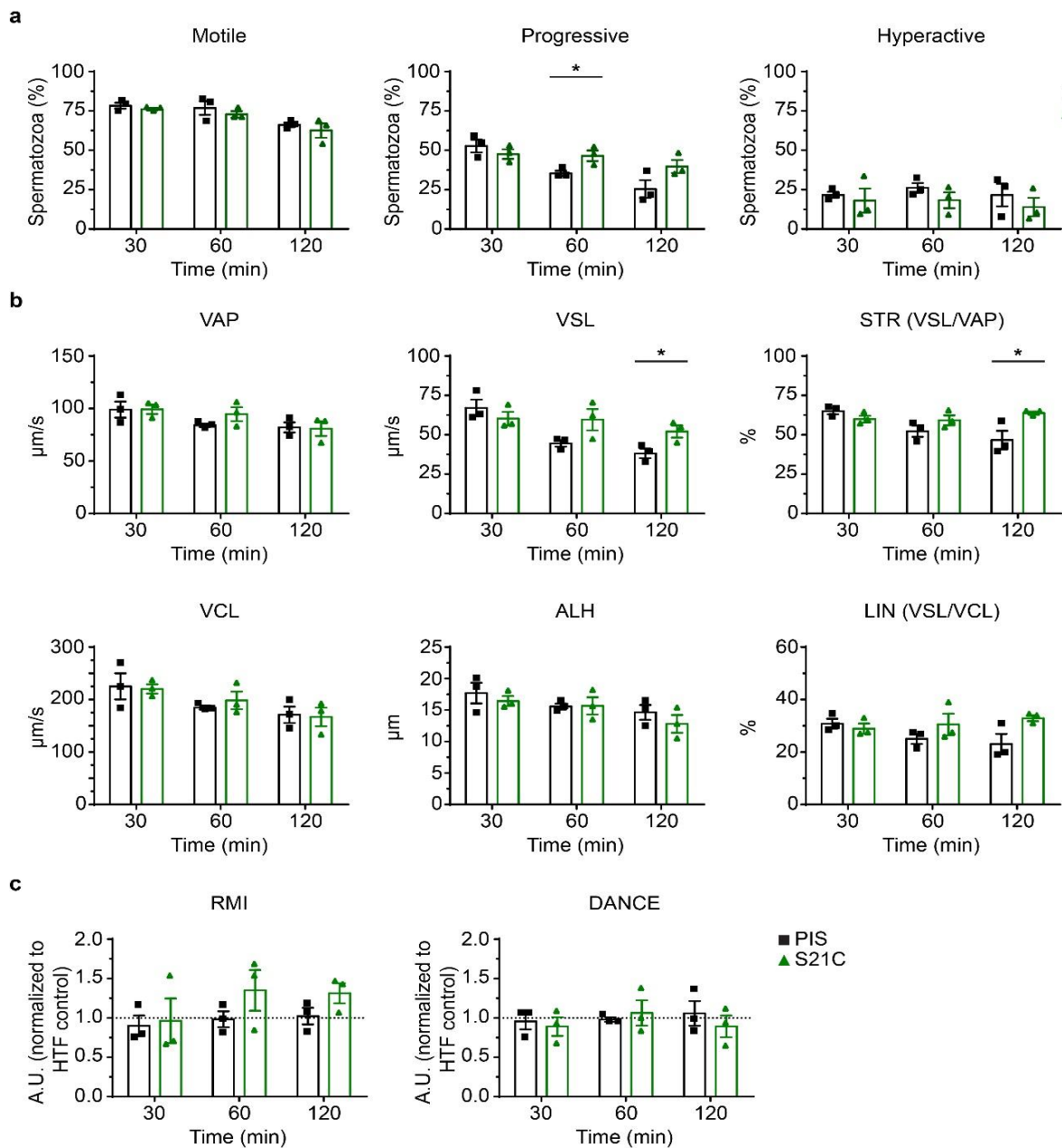
Supplementary Figure S1. EPPIN expression in mouse **(a)** EPPIN expression in Triton X-100 insoluble (P) and soluble (S) fractions of spermatozoa isolated from caput (including the initial segment), corpus, and cauda epididymidis by Western blot using anti-EPPIN Q20E antibody. Samples were processed for SDS-PAGE in non-reducing conditions. ACTB was used as an endogenous control. Negative control (-) was performed with primary antibody pre-adsorbed with recombinant EPPIN. **(b)** EPPIN expression in P and S fractions of non-capacitated (NC) and capacitated (CAP) spermatozoa. **(c)** Western blot detection of mouse recombinant GST-EPPIN (~ 38 kDa) using anti-EPPIN Q20E, S21C and F21C antibodies. Results are representative of 3 (a, b) and 2 (c) independent experiments.

Supplementary Figure 2



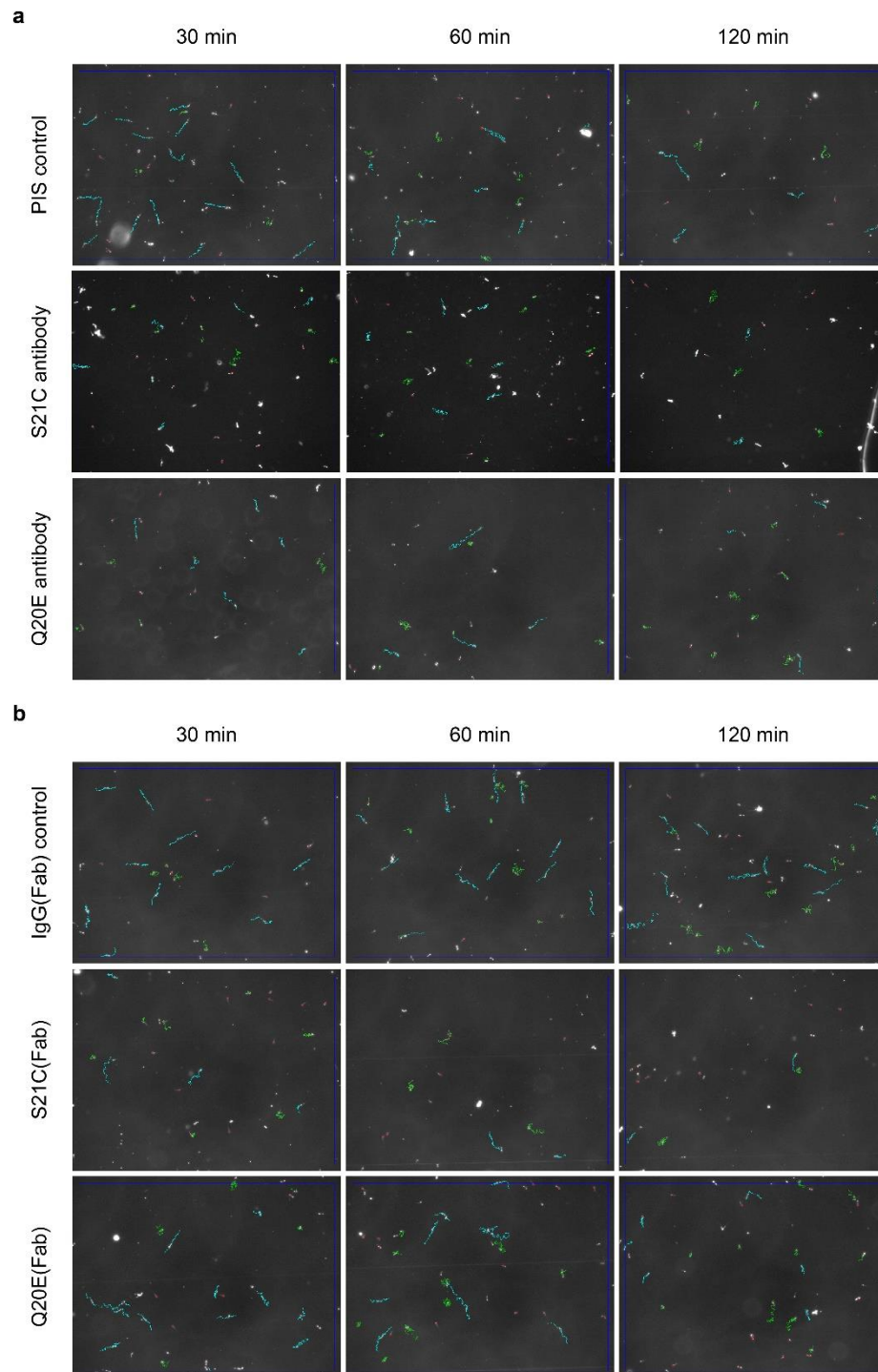
Supplementary Figure S2. EPPIN-positive immunostaining in non-capacitated and capacitated mouse spermatozoa using anti-EPPIN S21C and F21C antibodies. Spermatozoa isolated from the cauda epididymis and then submitted or not to in vitro capacitation for 90 min. Immunofluorescence experiments were performed in the presence or absence of saponin to obtain permeabilized (left panel) and non-permeabilized (right panel) spermatozoa, respectively. EPPIN-positive-immunostaining was detected on the head (arrowhead), midpiece (white arrow), and principal piece (yellow arrow) of the flagellum. Negative control was performed in the absence of primary antibodies. Cell nuclei were stained with DAPI in blue. Merg: Merged; PhC: Phase contrast. Scale bar: 50 μ m. Results are representative of 2-3 independent experiments.

Supplementary Figure 3



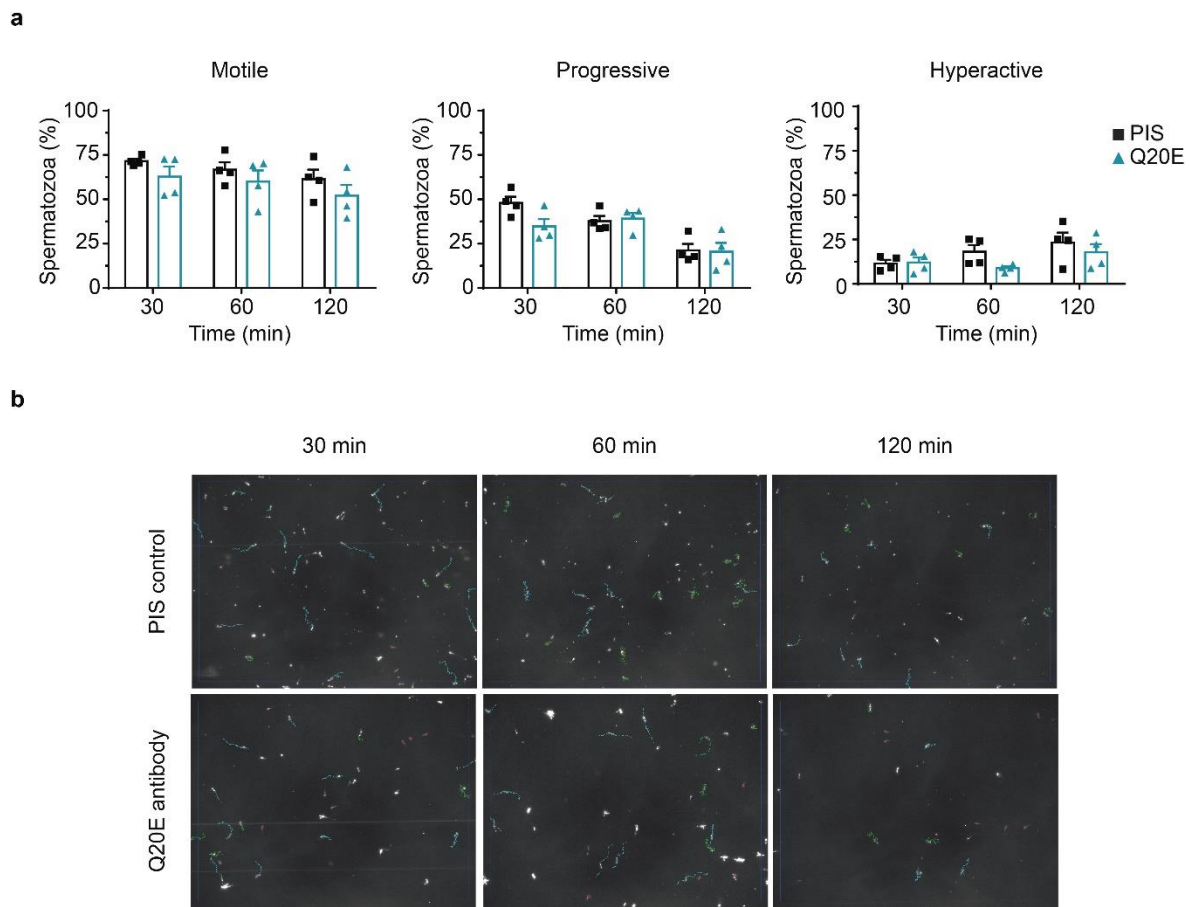
Supplementary Figure S3. Effects of anti-EPPIN F21C antibody on mouse sperm motility. Motility (**a**), Kinematics parameters (**b**), and index of relative motility inhibition (RMI) and DANCE (**c**) of spermatozoa incubated with F21C antibody (0.4 mg/ml), which maps the sequence F90-C110 in EPPIN C-terminus. Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) under the same conditions were used as controls. Sperm motility was evaluated 30, 60, and 120 min after incubation. Sperm tracks were classified as progressive when $VAP \geq 50 \mu\text{m/s}$ and $STR \geq 50\%$, and as hyperactive when $VLC \geq 180 \mu\text{m/s}$, $ALH \geq 9.5 \mu\text{m}$, and $LIN < 23.6\%$. VAP: average path velocity, VSL: straight-line velocity, STR: straightness, VCL: curvilinear velocity, ALH: amplitude of lateral head displacement, and LIN: linearity. RMI and DANCE were normalized to the values obtained using spermatozoa incubated with HTF medium only. *Indicates statistically different from the control group ($p < 0.05$; Student t test; see Results sections for p values). Percentage data were converted to arcsine values before statistical analysis. Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 3 mice, as indicated.

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure S4. Motility patterns of spermatozoa incubated with anti-EPPIN antibodies on mouse sperm motility. (a) Representative CASA screenshots displaying tracks of mouse spermatozoa incubated with S21C antibody (0.4 mg/ml) and Q20E antibody (0.6 mg/ml). Spermatozoa incubated with pre-immune serum (PIS) under the same conditions were used as controls. (b) Representative CASA screenshots displaying tracks of mouse spermatozoa incubated with S21C Fab fragments [S21C(Fab), 0.5 mg/ml and Q20E Fab fragments [Q20E(Fab), 0.6 mg/ml]. Spermatozoa incubated with normal rabbit IgG Fab fragments [IgG (Fab)] under the same conditions were used as controls. Sperm motility was evaluated 30, 60, and 120 min after incubation. Green = motile cells, cyan = progressive cells, red = static. Results are representative of data shown in Figures 2-5.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure S5. Effects of anti-EPPIN Q20E antibody on mouse sperm motility. (a) CASA analysis of mouse sperm motility and hyperactivation in the presence of anti-Q20E antibody. Spermatozoa from cauda epididymidis were incubated with HTF medium supplemented with 0.75% BSA containing or not 0.4 g/ml pre-immune serum (PIS, control) or Q20E anti-EPPIN antibody for 30-, 60- and 120-min. **(b)** CASA tracks of mouse epididymal spermatozoa incubated with 0.4 mg/ml pre-immune serum (PIS, control) or anti-EPPIN Q20E antibody for 60 min. Green = motile cells, cyan = progressive cells, red = static. *Indicates statistically different from PIS group ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey test). Percentage data were converted to arcsine values before statistical analysis. Results represent mean $\pm$ SEM from independent experiments performed with samples from 3-4 mice.

Supplementary Figure 6

EPPIN			
Human	mgssgllslvlvfvllanv	qgPGLTDWLFPRRCPKIREEC	74
Mouse	mklsghvslvlfgllarvqg	PSLADLLFPRRCPRFREECEHQERDLCTDRDCPKKEKCCVFNCGKKCLNPQQ	74
		qgPSLADLLFPRRCPRFREE (Q20E Ab)	
Human		DVCEMPKETGPCLAYFLHWWYDKDNTCSMFVYGGCGNNNNFQSKANCLNTCKNKRFP-	133
Mouse		DICSLPKDSGYCMAYFRWWFNKENSTCOVEFYGGCGNNNNFQSQSICQNAACEKKSSLT	134
		SMFVYGGCGNNNNFQSKAN (S21C Ab)	
		FLHWWYDKDNTCSMFVYGGC (F21C Ab)	

Supplementary Figure S6 - Schematic representation depicting the effects of anti-EPPIN S21C, F21C, and Q20E antibodies on sperm motility. S21C and F21C antibodies bind on EPPIN C-terminal domains and Q20E bind on N-terminal region. Protein sequence alignment of human (NP_065131) and mouse (NP_083601) EPPIN. The signal peptide is shown in lower case. The WFDC and Kunitz domain consensus sequences are underlined by continuous and dotted lines, respectively. Identical and similar amino acid residues are highlighted in yellow and gray, respectively. The anti-EPPIN S21C, F21C and Q20E antibody epitope sequences are in red, green and blue, respectively. S21C, F21C and Q20E sequences are 70%, 50% and 65% between human and murine EPPIN, respectively

Supplementary Table 1

Summary of the effects of anti-EPPIN antibodies on mouse sperm motility and kinematics parameters.

Anti-EPPIN Ab	Epitope	Time (min)	Motility parameters				Kinematics parameters				
			Total	Progressive	Hyperactive	VAP	VSL	STR	VCL	ALH	LIN
F21C (0.4 mg/ml)	C-terminal	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		60	-	↑ (p=0.041)	-	-	-	-	-	-	-
		120	-	-	-	-	↑ (p=0.046)	↑ (p=0.045)	-	-	-
S21C (0.4 mg/ml)	C-terminal	30	-	↓ (p=0.009)	-	-	↓ (p=0.016)	-	-	-	-
		60	↓ (p=0.005)	↓ (p=0.003)	-	↓ (p=0.036)	↓ (p=0.020)	-	↓ (p=0.039)	↓ (p=0.045)	-
		120	↓ (p=0.011)	-	↓ (p=0.002)	↓ (p=0.047)	-	↑ (p=0.002)	↓ (p=0.043)	↓ (p=0.045)	↑ (p=0.020)
S21C(Fab) (0.5 mg/ml)	C-terminal	30	↓ (p<0.001)	↓ (p=0.004)	-	-	↓ (p=0.046)	-	-	↓ (p=0.039)	↓ (p=0.048)
		60	↓ (p=0.001)	↓ (p=0.032)	-	↓ (p=0.033)	↓ (p=0.048)	-	-	↓ (p=0.033)	-
		120	↓ (p<0.001)	↓ (p=0.001)	↓ (p=0.018)	↓ (p=0.003)	↓ (p=0.048)	-	↓ (p=0.003)	↓ (p<0.001)	-
Q20E (0.6 mg/ml)	N-terminal	30	-	↓ (p=0.008)	-	↓ (p=0.022)	-	-	↓ (p=0.022)	↓ (p=0.006)	-
		60	-	↓ (p=0.014)	-	-	-	-	-	↓ (p=0.048)	-
		120	-	-	-	-	-	↑ (p=0.044)	-	-	↑ (p=0.044)
Q20E(Fab) (0.6 mg/ml)	N-terminal	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		60	↓ (p=0.027)	↓ (p=0.021)	-	-	-	-	-	-	-
		120	↓ (p=0.005)	↓ (p=0.010)	-	-	-	-	-	↓ (p=0.024)	-

Anti-EPPIN Ab	Epitope	Time (min)	RMI	DANCE
F21C (0.4 mg/ml)	C-terminal	30	-	-
		60	-	-
		120	-	-
S21C (0.4 mg/ml)	C-terminal	30	↓ (p=0.019)	-
		60	↓ (p=0.001)	↓ (p=0.001)
		120	-	↓ (p=0.003)
S21C(Fab) (0.5 mg/ml)	C-terminal	30	↓ (p=0.012)	-
		60	↓ (p=0.009)	↓ (p=0.037)
		120	↓ (p<0.001)	↓ (p<0.001)
Q20E (0.6 mg/ml)	N-terminal	30	-	↓ (p=0.011)
		60	-	-
		120	-	-
Q20E(Fab) (0.6 mg/ml)	N-terminal	30	-	-
		60	-	-
		120	↓ (p=0.004)	↓ (p<0.001)

Capítulo 3

Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E (IgG inteiro e fragmentos Fab) sobre vias de sinalização associadas à capacitação espermática.

Com base no efeito dos anticorpos anti-EPPIN sobre os parâmetros de motilidade, estabelecemos a hipótese de que o bloqueio dos epítomos S21C e Q20E promove inibição da motilidade progressiva e hiperativada via interferência na sinalização ACs/AMPC/PKA. Dessa forma, avaliamos os efeitos dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E sobre a fosforilação da PKA e produção de AMPc em espermatozoides incubados em condição que sustenta a capacitação, utilizando ensaios de AlphaScreen e Western blot, respectivamente.

Materiais e métodos

Análise temporal da relação PKA total/PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides murinos submetidos à capacitação

Os espermatozoides forem coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. As alíquotas dos espermatozoides foram imediatamente processadas (5.0×10^6 espermatozoides/ml) em 200 µl de meio TYH não-capacitante (NC) ou em condição capacitante (CAP) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%, m/v) na presença de IgG normal de coelho (0,3 mg/ml), ou anticorpo anti-EPPIN S21C ou Q20E (IgG inteiro ou Fragmento Fab) por 120 min à 37°C (5%/ 95% CO_2/ar). IgG normal de coelho e anticorpos anti-EPPIN foram dialisados contra meio TYH antes de serem incubados com os espermatozoides. As amostras dos espermatozoides foram lavadas com tampão fosfato-salino (Tampão PBS, pH 7.4), centrifugadas (800 x g, 24°C, 10min), ressuspendidas em Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X) (Thermo Fisher Scientific, #LC2676) aquecidas à 85°C por 5min (10 min) e fervidas a 85°C por 5 min. As amostras foram novamente centrifugadas (12,000 x g, 24°C, 5min) e o sobrenadante foi coletado. Os agentes redutores ditiotretol (DTT, Thermo Fisher Scientific, #B0009) e Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, Sigma Aldrich, #646547) foram adicionados ao sobrenadante e fervidos na mesma condição. Após nova centrifugação, coletamos o sobrenadante e separamos os extratos proteicos totais para eletroforese em gel Novex™ 10% SDS PAGE (m/v) (Thermo

Fisher Scientific, #XP00100BOX) a 225 V por 20min, utilizando tampão de corrida (Thermo Fisher Scientific, cat. #LC2675). Em seguida, transferimos as proteínas do gel para membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific, cat. #88520) em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, cat. #170-3940) a 15 V por 1 h (NuPage) ou a 20 V por 1h (Novex™ gel 10%), utilizando tampão de transferência (Thermo Fisher Scientific, cat. #NP0006 ou #LC3675). Verificamos a conformidade da transferência por coloração da membrana com corante amido black.

Após ativação com metanol, incubamos as membranas em solução de bloqueio [tampão TBS-T (Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, v/v), contendo 3% de soro bovino (m/v)] por 1,5 h. Em seguida, lavamos a membrana com tampão TBS-T e incubamos com anticorpo primário anti-PKA α (Sigma, cat. #SAB4502337; 1:800), anti-pPKA (Sigma, cat. #SAB4503969; 1:1500) e anti- α -tubulina (Abcam, cat. #ab125267; 1:500) como controle positivo das amostras foram diluídos em TBS-T contendo 1% de soro bovino (m/v)] e incubados por 2h. Após nova lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Peroxidase-conjugated AffinePure Donkey Anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Research, cat. # 711-035-152, 0,02 μ g/ml). Processamos as membranas para revelação das bandas imunorreativas com reagente Luminol Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, cat. #34095), utilizando sistema fotodocumentador G-BOX (SYNGENE) e/ou revelação em autorradiografia. Para o controle dos anticorpos primários anti-PKA α , anti-pPKA e anti- α -tubulina realizamos aos experimentos com a ausência de anticorpo primário. As imagens obtidas no ensaio de Western blot tiveram seu brilho e contraste ajustados e foram analisados utilizando ImageJ e o número de pixels para cada banda única ~40 kDa foram quantificadas utilizando como referência a amostra capacitante sem anticorpo (100%) e corrigido pela PKA total, utilizada como controle endógeno. Dados densitométricos foram expressos com unidades arbitrárias (U.A).

Determinação dos níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides murinos submetidos à capacitação

Os espermatozoides foram obtidos da cauda do epidídimo de camundongo. Resumidamente, os espermatozoides (1×10^6 espermatozoides/ml) foram pré-incubados por 30 minutos em meio TYH capacitante contendo ou não 0,4-0,6 mg/ml de imunoglobulina G normal de coelho (IgG, controle) ou anticorpo anti-EPPIN S21C ou Q20E e avaliados após 1 e 30 min de incubação. As suspensões foram lavadas 3x com 500 μ l de DPBS (0.5 mM IBMX), centrifugadas à 5.000 x g (5 min) e ressuspendidas em tampão estimulador 1X HBSS, 0.5 Mm IBMX (Sigma Aldrich, cat.#I5879), 5mM HEPES, 0,1% BSA (Sigma Aldrich, cat.#A7284) com pH ajustado para 7,2-7,5. As amostras foram diluídas em 25 μ l de tampão estimulador (40.000 espermatozoides/ μ l). As amostras foram analisadas em triplicata e a concentração de AMPc determinada a partir de curva padrão. A leitura para avaliação da concentração de AMPc (AlphaScreen cAMP Assay Detection Kit, cat.#6760635D) foi realizada em um leitor de microplaca Biotek Synergy (excitação 680/30 – emissão 570/100).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados percentuais foram convertidos em raiz quadrada dos valores de arcosseno antes da análise estatística. Aplicamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados, e o teste F ou Brown-Forsythe para avaliar a homocedasticidade dos dados. As diferenças entre mais de dois grupos foram analisadas pela variância de uma via (ANOVA). Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

Resultados e Discussão

Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E (Fragmento Fab) sobre a relação PKA total/PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides murinos submetidos à capacitação

Estudos recentes demonstraram que o anticorpo anti-EPPIN S21C (IgG inteiro e fragmento Fab) induziu perda da motilidade do espermatozoide humano por meio da acidificação do pHi e diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelulares (O'RAND & WIDGREN, 2012; O'RAND *et al.*, 2016). De forma semelhante, nossos resultados demonstraram que este anticorpo inibiu a motilidade progressiva e hiperativada do espermatozoide murino (ver capítulo 2). Uma vez que os anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E demonstraram regular os parâmetros de motilidade e cinemática espermática, decidimos investigar seus efeitos sobre a relação entre PKA/p-PKA por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem a sua subunidade catalítica total (anti-PKA) e fosforilada na posição Thr197 (anti-p-PKA).

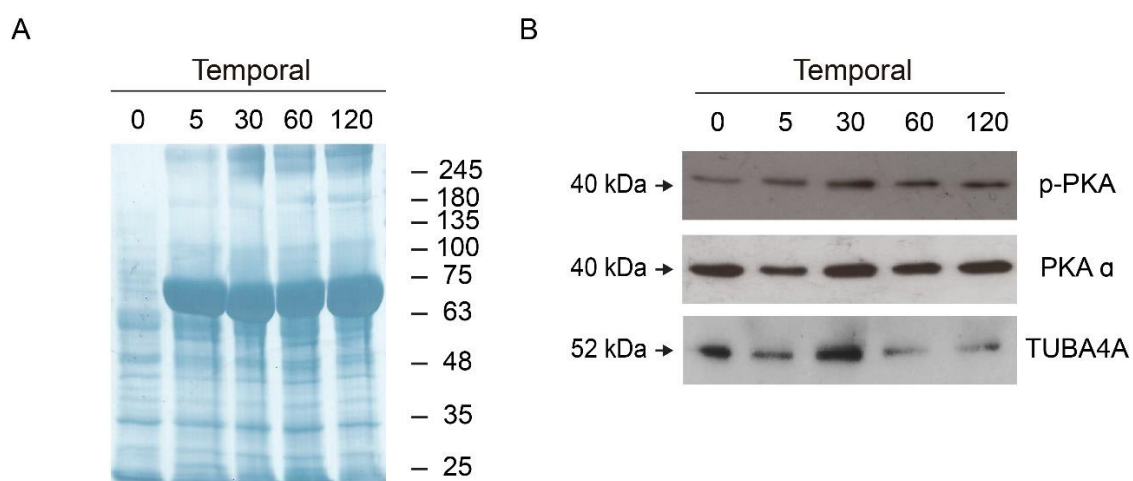


Figura 6. Expressão temporal da PKA total e PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides de camundongo durante a capacitação espermática. (A) Perfil proteico temporal das frações celulares obtido a partir de espermatozoides de camundongo. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. Amostras dos espermatozoides (5×10^6 células/ml) foram imediatamente processadas em condições não-capacitante (0 min) ou incubados sobre condição que sustenta a capacitação (5-120min) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%). (B) As membranas foram incubadas com anticorpo anti-PKA total ou anti-p-PKA. TUBA4A foi utilizado como controle endógeno. As setas indicam bandas positivas imunorreativas de ~52 kDa da TUBA4A e PKA/p-PKA de ~40 kDa. PM indica um padrão de peso de proteínas. Resultados são representativos de 4 experimentos independentes.

A análise dos ensaios de *Western blot* revelou a presença de bandas imunorreativas para PKA total e p-PKA como banda única e dentro da massa molecular esperada de ~40 kDa (Figura 6A, Anexo I- A, B). Ensaios de controle negativo, realizados na ausência dos anticorpos primários, confirmaram a especificidade das bandas imunorreativas para todos os anticorpos analisados (Anexo II). A análise qualitativa da intensidade das bandas imunorreativas para a PKA total e p-PKA sugeriu aumento dependente do tempo da fosforilação da p-PKA, indicando que a capacitação altera o status de fosforilação da PKA (Figura 6B). Ressaltamos, entretanto, que ensaios adicionais serão necessários para investigar o mecanismo pelo qual a capacitação modula a fosforilação da PKA.

A incubação dos espermatozoides com anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E (IgG inteiro) resultou na detecção de bandas imunorreativas inespecíficas, em decorrência da interação entre as cadeias leve e pesada do IgG de coelho pelo anticorpo secundário anti-coelho (Anexo III). Para solucionar esse problema, incubamos os espermatozoides com os fragmentos Fab dos anticorpos S21C (S21C-Fab) e Q20E (Q20E-Fab), o que resultou na ausência de bandas inespecíficas. Como controle do ensaio, incubamos os espermatozoides com fragmento Fab de IgG normal de coelho (IgG-Fab) nas mesmas condições.

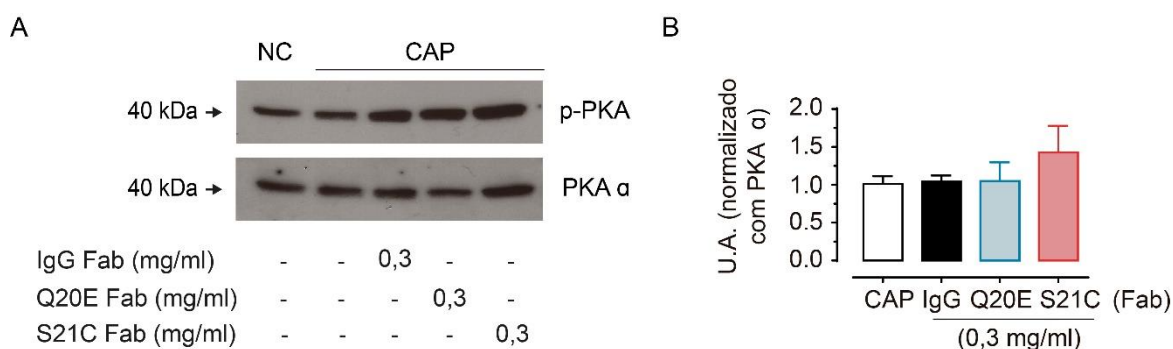


Figura 7. Efeito dos anticorpos anti-EPPIN que se ligam aos domínios WFDC (N-terminal) e Kunitz (C-terminal) da EPPIN sobre a expressão da PKA total ou PKA fosforilada (p-PKA) em espermatozoides de camundongo durante a capacitação espermática. (A) Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. Amostras dos espermatozoides (5×10^6 células/ml) processadas em condições não-capacitante (NC) ou capacitante (CAP) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%) na ausência ou presença de anticorpo (0,3 mg/ml) anti-EPPIN Q20E Fab ou S21C Fab ou IgG normal de coelho (controle). As membranas foram incubadas com anticorpo anti-PKA total ou anti-PKA fosforilada. As setas indicam bandas positivas imunorreativas da PKA total e p-PKA de ~40 kDa. PM indica um padrão de peso de proteínas (kDa). **(B)** Análise densitométrica da relação PKA/p-PKA expressa em unidades arbitrárias. Os valores de unidade arbitrária foram expressos como média $\pm$ EPM de experimentos independentes realizados com amostras de 2-3 camundongos.

Nossos resultados demonstraram que tanto o S21C-Fab quanto o Q20E-Fab não produziram alterações na relação PKA/p-PKA em comparação com amostras de espermatozoides submetidas à capacitação na ausência de anticorpos ou presença de IgG-Fab (Figura 7A, B). No entanto, ressaltamos que a análise densitométrica revelou que o S21C-Fab induziu aumento de ~1,6 vezes na relação PKA/p-PKA em comparação com o grupo IgG-Fab, embora o nível de significância estatística não tenha sido atingido (Figura 7B). Apesar dos dados sugerirem um efeito do bloqueio do epítipo S21C sobre a relação PKA/p-PKA durante a capacitação espermática, a variação dos resultados entre experimentos ainda não nos afirma a manifestação de tal efeito. A expansão do N experimental será necessária para confirmar esses resultados.

Efeito dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E sobre a determinação dos níveis intracelulares de AMPc

O segundo mensageiro AMPc orchestra diferentes aspectos da função espermática necessárias para aquisição da capacidade fértil, incluindo a transição da motilidade progressiva para hiperativada e indução da exocitose acrossomal (BUFFONE *et al.*, 2014). Deste modo, investigamos os efeitos dos anticorpos anti-EPPIN S21C e Q20E sobre os níveis intracelulares de AMPc de espermatozoides durante a capacitação. Para isto, empregamos a tecnologia AlphaScreen (Perkin-Elmer), um ensaio de fluorescência baseado na capacidade do AMPc proveniente da amostra biológica de reduzir a interação entre nanoesferas doadoras e aceptores via AMPc biotinilado.

Em nossos ensaios de padronização, confirmamos o aumento da detecção do AMPc conforme o aumento da número de espermatozoides utilizados nas análises (Figura 8A, B). Dessa forma, buscando manter os valores de fluorescência dentro dos limites mínimo e máximo da curva padrão de AMPc, realizamos os demais experimentos com a concentração de 40.000 espermatozoides/ μ l, o que rendeu concentrações satisfatórias de AMPc (~0,4 nM), dentro dos limites de detecção do kit (Figura 8A, B).

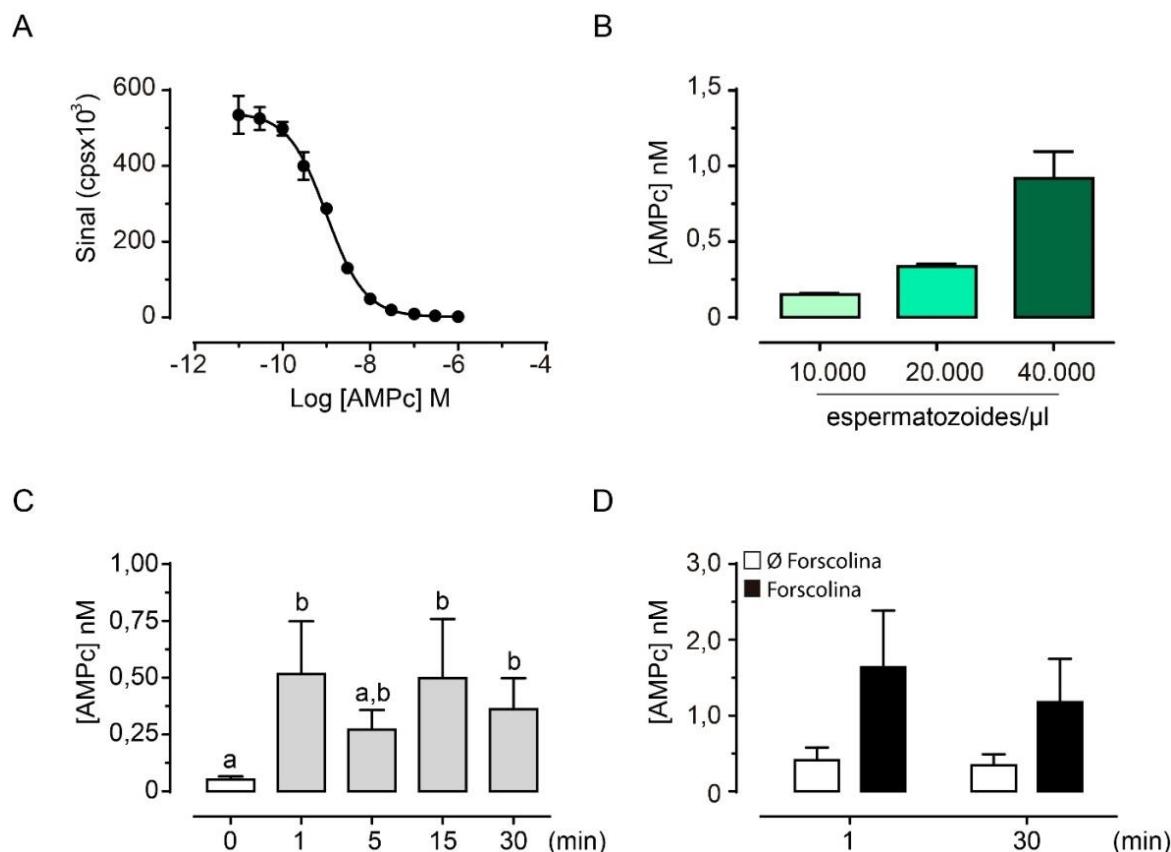


Figura 8. Determinação dos níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides de camundongo. (A) Curva padrão de AMPc AlphaScreen representativa realizada em um leitor de microplaca Biotek Synergy. (B) Determinação dos níveis intracelulares de AMPc em diferentes concentrações (10.000, 20.000 e 40.000 espermatozoides/ μ l) de espermatozoides de camundongo. (C) Determinação temporal dos níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides de camundongo (D) Níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides de camundongo na ausência (quadrado branco) ou presença (quadrado preto) de forskolina (30 μ M) após 1 e 30 min de incubação. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. Amostras dos espermatozoides (1×10^6 células/ml) foram imediatamente processadas em condições não-capacitante ou capacitante (1-30min) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%). Valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n=4-6$ experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey).

Em seguida, analisamos o efeito da capacitação espermática sobre a produção temporal de AMPc. Para tal, incubamos os espermatozoides em condições que sustentam a capacitação (meio de cultura contendo HCO_3^- e BSA) por 1, 5, 15 e 30 min. Nossos resultados demonstraram padrão bifásico no conteúdo de AMPc espermático induzido pela capacitação. Observamos aumento das concentrações intracelulares de AMPc (~10 vezes) apenas 1 min após a incubação dos espermatozoides em meio capacitante, as quais retornaram aos valores semelhantes aos observados em espermatozoides não-capacitados após 5 min (Figura 8C). Um novo aumento na concentração de AMPc foi observado após 15 (~9 vezes) e 30 min (~7 vezes) de capacitação (Figura 8C). Curiosamente, o tratamento com forskolina (30 μ M), um ativador de isoformas transmembranares da AC, por 1 e 30 min induziu aumento de ~3 e ~2 vezes das concentrações

espermáticas de AMPc em comparação com amostras não tratadas, respectivamente; efeito este que não atingiu o nível de significância na análise estatística (Figura 8D). Esses resultados sustentam o papel central da ACs na produção de AMPc induzida pela capacitação espermática (CARLSON *et al.*, 2005; WERTHEIMER *et al.*, 2013).

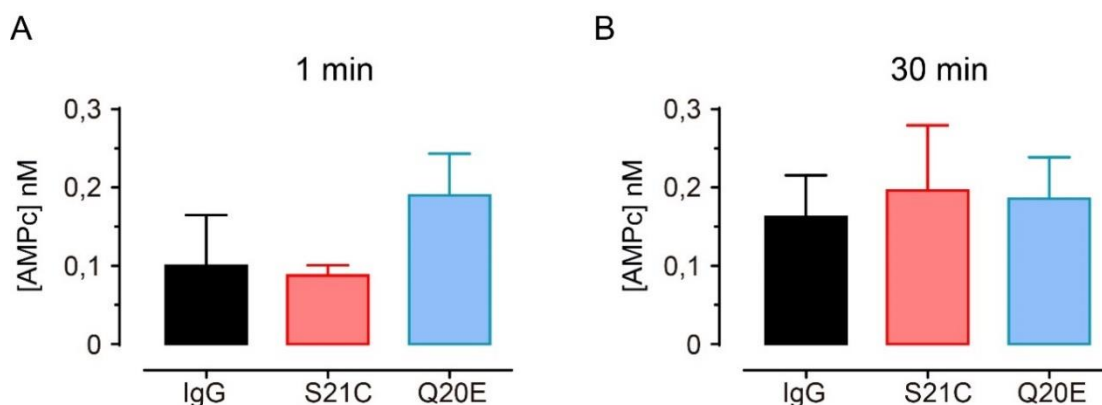


Figura 9. Efeito dos anticorpos anti-EPPIN que se ligam aos domínios WFDC (N-terminal) e Kunitz (C-terminal) da EPPIN sobre os níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides de camundongo. Níveis intracelulares de AMPc em espermatozoides de camundongos pré-incubados em meio não-capacitante (30 min) contendo ou não 0,4-0,6 mg/ml de IgG normal de coelho (controle) ou anticorpos anti-EPPIN S21C ou Q20E e analisados após **(A)** 1 e **(B)** 30 min de incubação. Amostras dos espermatozoides (1×10^6 células/ml) foram processadas em condição que suportam a capacitação (1-30min) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%). As amostras foram analisadas em triplicata e a concentração de AMPc determinada a partir da curva padrão. Valores foram expressos como média $\pm$ EPM, n=3 experimentos independentes.

A incubação dos espermatozoides com os anticorpos S21C e Q20E não modificou o padrão de concentração de AMPc em espermatozoides submetidos à capacitação por 1 e 30 min em comparação com o grupo controle tratado com IgG normal de coelho (Figura 9A, B). Esses resultados não estão de acordo com a observação de que a incubação de espermatozoides humanos com anticorpos anti-EPPIN isolados dos macacos inférteis imunizados com a EPPIN recombinante humana resultou no acúmulo de AMPc, indicando uma correlação entre a perda de motilidade progressiva e a incapacidade de utilizar o AMPc (O'RAND *et al.*, 2009). Dessa forma, nossos resultados sugerem a existência de mecanismos diferentes pelos quais o bloqueio da EPPIN inibe a motilidade de espermatozoides em humanos e camundongos. Sabe-se que a atividade tanto da ACs quanto da PKA é regulada de forma concomitante pelo aumento do pH e das concentrações de Ca^{2+} intracelulares (NOLAN *et al.*, 2004; WIESNER *et al.*, 1998). Dessa forma, é possível que o efeito dos anticorpos anti-EPPIN sobre a motilidade do espermatozoide

murino seja mediado por eventos moleculares subsequentes à ativação da PKA. Apesar de não termos atingido o nível de significância, o aumento da relação PKA/p-PKA observado neste estudo corrobora esta hipótese, que merece ser investigada em futuros estudos.

Capítulo 4

CONCLUSÃO

No presente trabalho, demonstramos que a maturação epididimária e a capacitação espermática exercem um papel fundamental na expressão e localização da EPPIN. Nossos achados demonstram que a maturação epididimária, mas não a capacitação, influencia na associação da EPPIN com os diferentes compartimentos celulares do espermatozoide murino. Essa descoberta de que a EPPIN está presente em estruturas celulares associadas ao citoesqueleto e a membranas no espermatozoide murino maduro ampliou os possíveis cenários pelos quais essa proteína atua no controle da modulação espermática. Além disso, confirmamos o papel crítico do domínio Kunitz da EPPIN na modulação da motilidade espermática e da sua mudança de progressiva para hiperativada, um evento crucial para a reprodução. A semelhança entre os efeitos do anticorpo S21C na forma de IgG inteira ou fragmento Fab indica que apenas a ligação monovalente ao epítopo é suficiente para afetar a motilidade progressiva e hiperativada. Em paralelo, o anticorpo anti-EPPIN Q20E inibiu parâmetros de motilidade espermática, demonstrando que a sequência Q20-E39 presente no domínio WFDC pode também estar envolvida nos efeitos de ligação da EPPIN com outros ligantes sobre essa função fundamental para a fertilidade masculina.

Em conjunto, nossas descobertas ampliam o conhecimento sobre o papel dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN na regulação da função espermática. Esses resultados abrem espaços para o desenvolvimento de novas drogas contraceptivas que se liguem simultaneamente em ambos os resíduos dos domínios WFDC e Kunitz da EPPIN. Desse modo, ampliando a criação de novos compostos contraceptivos não-hormonais com grande eficácia terapêutica e que possam interferir em mecanismos cruciais para função do espermatozoide

Referências bibliográficas dos capítulos 1 e 3

AITKEN, R. J.; NIXON, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 785–793, 2013.

ANDERSON, M. P.; GREGORY, R. J.; THOMPSON, S.; SOUZA, D. W.; PAUL, S.; MULLIGAN, R. C.; SMITH, A. E.; et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 253, n. 5016, p. 202–205, 1991.

ARIFUZZAMAN, S.; RAHMAN, M. S.; PANG, M.-G. Research update and opportunity of non-hormonal male contraception: Histone demethylase KDM5B-based targeting. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 141, p. 1–20, 2019.

ARNOULT, C.; KAZAM, I. G.; VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S.; VILLAZ, M.; FLORMAN, H. M. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 12, p. 6757–6762, 1999.

ATTARDI, B. J.; HILD, S. A.; REEL, J. R. Dimethandrolone undecanoate: a new potent orally active androgen with progestational activity. **Endocrinology**, [s. l.], v. 147, n. 6, p. 3016–3026, 2006.

ATTARDI, B. J.; MARCK, B. T.; MATSUMOTO, A. M.; KODURI, S.; HILD, S. A. Long-term effects of dimethandrolone 17 β -undecanoate and 11 β -methyl-19-nortestosterone 17 β -dodecylcarbonate on body composition, bone mineral density, serum gonadotropins, and androgenic/anabolic activity in castrated male rats. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 183–192, 2011.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. **Australian Journal of Scientific Research. Ser. B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 581–596, 1951.

AZEVEDO, M. F.; FAUCZ, F. R.; BIMPAKI, E.; HORVATH, A.; LEVY, I.; DE ALEXANDRE, R. B.; AHMAD, F. et al. Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs). **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 195–233, 2014.

BALESTRINI, P. A.; JABLOŃSKI, M.; SCHIAVI-EHRENHAUS, L. J.; MARÍN-BRIGGILER, C. I.; SÁNCHEZ-CÁRDENAS, C.; DARSZON, A.; KRAPP, D. et al. Seeing is believing: Current methods to observe sperm acrosomal exocytosis in real time. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. 1188–1198, 2020.

BARO GRAF, C.; RITAGLIATI, C.; STIVAL, C.; LUQUE, G. M.; GENTILE, I.; BUFFONE, M. G.; KRAPP, D. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 518, p. 110992, 2020.

BELLEANNÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 349, n. 3, p. 717–731, 2012.

BELMONTE, S. A.; MAYORGA, L. S.; TOMES, C. N. The Molecules of Sperm Exocytosis. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**, [s. l.], v. 220, p. 71–92, 2016.

BUCK, J.; SINCLAIR, M. L.; SCHAPAL, L.; CANN, M. J.; LEVIN, L. R. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 79–84, 1999.

BUFFONE, M. G.; IJIRI, T. W.; CAO, W.; MERDIUSHEV, T.; AGHAJANIAN, H. K.; GERTON, G. L. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm

acrosomal exocytosis and motility. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 4–18, 2012.

BUFFONE, M. G.; WERTHEIMER, E. V.; VISCONTI, P. E.; KRAPP, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, The role of soluble adenylyl cyclase in health and disease. [s. l.], v. 1842, n. 12, Part B, The role of soluble adenylyl cyclase in health and disease, p. 2610–2620, 2014.

BUNCH, D. O.; WELCH, J. E.; MAGYAR, P. L.; EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 834–841, 1998.

BURTON, K. A.; MCKNIGHT, G. S. PKA, Germ Cells, and Fertility. **Physiology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 40–46, 2007.

CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMIÑANA, C.; DEL OLMO, D.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, [s. l.], v. 47 Suppl 3, p. 12–21, 2012.

CARLSON, A. E.; BURNETT, L. A.; DEL CAMINO, D.; QUILL, T. A.; HILLE, B.; CHONG, J. A.; MORAN, M. M. et al. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. **PloS One**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. e6844, 2009.

CARLSON, A. E.; QUILL, T. A.; WESTENBROEK, R. E.; SCHUH, S. M.; HILLE, B.; BABCOCK, D. F. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 37, p. 32238–32244, 2005.

CARLSON, A. E.; WESTENBROEK, R. E.; QUILL, T.; REN, D.; CLAPHAM, D. E.; HILLE, B.; GARBERS, D. L. et al. CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 25, p. 14864–14868, 2003.

CAUTHRON, R. D.; CARTER, K. B.; LIAUW, S.; STEINBERG, R. A. Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1416–1423, 1998.

CHAMBERLAIN, S. G.; VOGELSONG, K. M.; WEINBERGER, M.; SERAZIN, E.; CAIRNS-SMITH, S. Reboot contraceptives research — it has been stuck for decades. **Nature**, [s. l.], v. 587, n. 7835, p. 543–545, 2020.

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, [s. l.], v. 168, n. 4277, p. 697–698, 1951.

CHÁVEZ, J. C.; FERREIRA, J. J.; BUTLER, A.; DE LA VEGA BELTRÁN, J. L.; TREVIÑO, C. L.; DARSZON, A. et al. SLO3 K⁺ channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, n. 46, p. 32266–32275, 2014.

CHÁVEZ, J. C.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; WERTHEIMER, E.; VISCONTI, P. E.; DARSZON, A.; TREVIÑO, C. L. Participation of the Cl[−]/HCO₃[−] Exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl[−] Channel CFTR, and the Regulatory Factor SLC9A3R1 in Mouse Sperm Capacitation1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 86, n. 1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094037>>. Acesso em: 26 ago. 2021.

CHEN, J.-H.; CAI, Z.; SHEPPARD, D. N. Direct sensing of intracellular pH by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 51, p. 35495–35506, 2009.

CHEN, Y.; CANN, M. J.; LITVIN, T. N.; IOURGENKO, V.; SINCLAIR, M. L.; LEVIN, L. R.; BUCK, J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 289, n. 5479, p. 625–628, 2000.

CHRONOPOULOU, E.; HARPER, J. C. IVF culture media: past, present and future. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 39–55, 2015.

CLAUSS, A.; LILJA, H.; LUNDWALL, Å. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, [s. l.], v. 333, n. 2, p. 383–389, 2005.

COHEN, D. J.; ELLERMAN, D. A.; CUASNICÚ, P. S. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 462–468, 2000.

COHEN, D. J.; MALDERA, J. A.; VASEN, G.; ERNESTO, J. I.; MUÑOZ, M. W.; BATTISTONE, M. A. et al. Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 672–678, 2011.

COMNINOS, A. N.; JAYASENA, C. N.; DHILLO, W. S. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 153–174, 2014.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 76, p. 481–511, 2007.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 213–227, 2009.

COVIELLO, A. D.; BREMNER, W. J.; MATSUMOTO, A. M.; HERBST, K. L.; AMORY, J. K.; ANAWALT, B. D. et al. Intratesticular testosterone concentrations comparable with serum levels are not sufficient to maintain normal sperm production in men receiving a hormonal contraceptive regimen. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 931–938, 2004.

CURCI, L.; CARVAJAL, G.; SULZYK, V.; GONZALEZ, S. N.; CUASNICÚ, P. S. Pharmacological Inactivation of CatSper Blocks Sperm Fertilizing Ability Independently of the Capacitation Status of the Cells: Implications for Non-hormonal Contraception. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 686461, 2021.

DA ROS, V. G.; MALDERA, J. A.; WILLIS, W. D.; COHEN, D. J.; GOULDING, E. H.; GELMAN, D. M. et al. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). **Developmental Biology**, [s. l.], v. 320, n. 1, p. 12–18, 2008.

D'ANDREA, M. R.; QIU, Y.; HAYNES-JOHNSON, D.; BHATTACHARJEE, S.; KRAFT, P.; LUNDEEN, S. Expression of PDE11A in normal and malignant human tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 895–903, 2005.

DARSZON, A.; ACEVEDO, J. J.; GALINDO, B. E.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; NISHIGAKI, T.; TREVIÑO, C. L. et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 977–988, 2006.

DARSZON, A.; NISHIGAKI, T.; BELTRAN, C.; TREVIÑO, C. L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 1305–1355, 2011.

DE LAMIRANDE, E.; YOSHIDA, K.; YOSHIIKE, T. M.; IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 672–679, 2001.

DEMARCO, I. A.; ESPINOSA, F.; EDWARDS, J.; SOSNIK, J.; DE LA VEGA-BELTRAN, J. L.; HOCKENSMITH, J. W.; KOPF, G. S. et al. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 9, p. 7001–7009, 2003.

DING, X.; ZHANG, J.; BIAN, Z.; XIA, Y.; LU, C.; GU, A. et al. Variants in the Eppin gene show association with semen quality in Han-Chinese population. **Reproductive Biomedicine Online**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 125–131, 2010. a.

DING, X.; ZHANG, J.; FEI, J.; BIAN, Z.; LI, Y.; XIA, Y.; LU, C.; SONG, L.; WANG, S.; WANG, X. Variants of the EPPIN gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1657–1665, 2010. b.

DJUREINOVIC, D.; FAGERBERG, L.; HALLSTRÖM, B.; DANIELSSON, A.; LINDSKOG, C.; UHLÉN, M.; PONTÉN, F. The human testis-specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 476–488, 2014.

DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. A. Androgens and male fertility. **World Journal of Urology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 341–345, 2003.

DREVET, J. R. Epididymal approaches to male contraception. **Basic and Clinical Andrology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 12, 2018.

EDDY, E. M. CHAPTER 1 - The Spermatozoon Gamete Biology Section, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p. 3–54.

ELLERMAN, D. A.; BUSSO, D.; MALDERA, J. A.; CUASNICÚ, P. S. Immunocontraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 199–205, 2008.

ERNESTO, J. I.; WEIGEL MUÑOZ, M.; BATTISTONE, M. A.; VASEN, G.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, P.; ORTA, G.; FIGUEIRAS-FIERRO, D. et al. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 210, n. 7, p. 1213–1224, 2015.

ESPINOSA, F.; DARSZON, A. Mouse sperm membrane potential: changes induced by Ca²⁺. **FEBS letters**, [s. l.], v. 372, n. 1, p. 119–125, 1995.

FARDILHA, M.; ESTEVES, S. L. C.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; VINTÉM, A. P.; DOMINGUES, S. C.; REBELO, S.; MORRICE, N. et al. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 82, n. 10, p. 1403–1415, 2011.

FISCH, J. D.; BEHR, B.; CONTI, M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1248–1254, 1998.

FLORMAN, H. M.; DUCIBELLA, T. CHAPTER 2 - Fertilization in Mammals. In: NEILL, J. 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. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 2–12, 2017.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 107, n. 3–4, p. 229–236, 2008.

GALANTINO-HOMER, H. L.; VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 707–719, 1997.

GANGWAR, D. K.; ATREJA, S. K. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 705–711, 2015.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in sperm during epididymal maturation. **Andrology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 204–218, 2017.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 731–801, 2003.

GU, Y.-Q.; TONG, J.-S.; MA, D.-Z.; WANG, X.-H.; YUAN, D.; TANG, W.-H.; BREMNER, W. J. Male hormonal contraception: effects of injections of testosterone undecanoate and depot medroxyprogesterone acetate at eight-week intervals in chinese men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 2254–2262, 2004.

GUIPPONI, M.; SCOTT, H. S.; KUDOH, J.; KAWASAKI, K.; SHIBUYA, K.; SHINTANI, A.; ASAKAWA, S. et al. Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence. **Human Genetics**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 386–392, 1998.

GUO, X.-Q.; WANG, R.-J. [Advances in the study of epididymal protease inhibitor]. **Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 851–853, 2005.

HARAYAMA, H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. **The Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 421–430, 2013.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of rete testicular and cauda epididymal boar spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with egg plasma membrane. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 62–68, 1993.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; SOSNIK, J.; EDWARDS, J.; ACEVEDO, J. J.; MENDOZA-LUJAMBIO, I.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 9, p. 5623–5633, 2006.

HESS, K. C.; JONES, B. H.; MARQUEZ, B.; CHEN, Y.; ORD, T. S.; KAMENETSKY, M.; MIYAMOTO, C. et al. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 249–259, 2005.

HIHNALA, S.; KUJALA, M.; TOPPARI, J.; KERE, J.; HOLMBERG, C.; HÖGLUND, P. Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 107–111, 2006.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 122, n. 4, p. 519–526, 2001.

HÖGLUND, P.; HIHNALA, S.; KUJALA, M.; TIITINEN, A.; DUNKEL, L.; HOLMBERG, C. Disruption of the SLC26A3-mediated anion transport is associated with male subfertility. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 232–235, 2006.

ILANI, N.; ROTH, M. Y.; AMORY, J. K.; SWERDLOFF, R. S.; DART, C.; PAGE, S. T. et al. A new combination of testosterone and nesterone transdermal gels for male hormonal contraception. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 3476–3486, 2012.

INOUE, N.; IKAWA, M.; ISOTANI, A.; OKABE, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. **Nature**, [s. l.], v. 434, n. 7030, p. 234–238, 2005.

JIMENEZ, T.; MCDERMOTT, J. P.; SÁNCHEZ, G.; BLANCO, G. Na,K-ATPase $\alpha 4$ isoform is essential for sperm fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 644–649, 2011.

JOHNSON, M. H. Robert Edwards: the path to IVF. **Reproductive Biomedicine Online**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 245–262, 2011.

KAY, V. J.; ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 776–786, 1998.

KIRCHHOFF, C. CD52 is the “major maturation-associated” sperm membrane antigen. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 9–17, 1996.

KIRICHOK, Y.; LISHKO, P. V. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 478–499, 2011.

KLENTZERIS, L. D.; FISHEL, S.; MCDERMOTT, H.; DOWELL, K.; HALL, J.; GREEN, S. A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 728–733, 1995.

KOCH, S.; ACEBRON, S. P.; HERBST, J.; HATIBOGLU, G.; NIEHRS, C. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 5, p. 1225–1236, 2015.

KOHANE, A. C.; GONZÁLEZ ECHEVERRÍA, F. M. C.; PIÑEIRO, L.; BLAQUIER, J. A. Interaction of Proteins of Epididymal Origin with Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 737–742, 1980.

KOPF, G. S. Approaches to the identification of new nonhormonal targets for male contraception. **Contraception**, [s. l.], v. 78, n. 4 Suppl, p. S18–22, 2008.

KRAPF, D.; ARCELAY, E.; WERTHEIMER, E. V.; SANJAY, A.; PILDER, S. H.; SALICIONI, A. M.; VISCONTI, P. E. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 11, p. 7977–7985, 2010.

KRETZER, D. M. De; LOVELAND, K. A. L.; O'BRYAN, M. K. Spermatogenesis. **Endocrinology: Adult & Pediatric**, [s. l.], p. 2325–2353, 2016.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate-Dependent Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Relation to Human Sperm Capacitation and Motility1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 684–692, 1996.

LEFIÈVRE, L.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 423–430, 2002.

LHUIILLIER, P.; RODE, B.; ESCALIER, D.; LORÈS, P.; DIRAMI, T.; BIENVENU, T.; GACON, G.; DULIOUST, E.; TOURÉ, A. Absence of annulus in human asthenozoospermia: Case Report†. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1296–1303, 2009.

LIN, S.; KE, M.; ZHANG, Y.; YAN, Z.; WU, J. Structure of a mammalian sperm cation channel complex. **Nature**, [s. l.], v. 595, n. 7869, p. 746–750, 2021.

LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 588, n. Pt 23, p. 4667–4672, 2010.

LIU, P. Y.; SWERDLOFF, R. S.; ANAWALT, B. D.; ANDERSON, R. A.; BREMNER, W. J.; ELLIESEN, J.; GU, Y.-Q. et al. Determinants of the rate and extent of spermatogenic suppression during hormonal male contraception: an integrated analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 1774–1783, 2008.

LIU, Y.; WANG, D.-K.; CHEN, L.-M. The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 99, 2012.

LIU, Y.; YANG, J.; CHEN, L.-M. Structure and Function of SLC4 Family HCO₃⁻ Transporters. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 6, p. 355, 2015.

LONG, J. E.; LEE, M. S.; BLITHE, D. L. Male Contraceptive Development: Update on Novel Hormonal and Nonhormonal Methods. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 153–160, 2019.

LONG, J. E.; LEE, M. S.; BLITHE, D. L. Update on Novel Hormonal and Nonhormonal Male Contraceptive Development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 106, n. 6, p. e2381–e2392, 2021.

LUE, Y.; WANG, C.; LYDON, J. P.; LEUNG, A.; LI, J.; SWERDLOFF, R. S. Functional role of progestin and the progesterone receptor in the suppression of spermatogenesis in rodents. **Andrology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 308–317, 2013.

MANNOWETZ, N.; MILLER, M. R.; LISHKO, P. V. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 114, n. 22, p. 5743–5748, 2017.

MARIANI, N. A. P.; CAMARA, A. C.; SILVA, A. A. S.; RAIMUNDO, T. R. F.; ANDRADE, J. J.; ANDRADE, A. D.; ROSSINI, B. C. et al. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 506, p. 110754, 2020.

MARTIN-DELEON, P. A. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 720–725, 2015.

MARTÍNEZ, P.; MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, [s. l.], v. 1, p. d103-117, 1996.

MARTINEZ, S. L. P.; HELMAN, R. J. M.; ZITTA, K. S.; BRANDELLI, A.; MIRANDA, P. V. Characterization of human sperm N-acetylglucosaminidase. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 315–324, 2008.

MATHEW, V.; BANTWAL, G. Male contraception. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 910–917, 2012.

MATZUK, M. M.; MCKEOWN, M. R.; FILIPPAKOPOULOS, P.; LI, Q.; MA, L.; AGNO, J. E.; LEMIEUX, M. E. et al. Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. **Cell**, [s. l.], v. 150, n. 4, p. 673–684, 2012.

MCCRUDDEN, M. T. C.; DAFFORN, T. R.; HOUSTON, D. F.; TURKINGTON, P. T.; TIMSON, D. J. Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 275, n. 8, p. 1742–1750, 2008.

MEDINA, J. F.; RECALDE, S.; PRIETO, J.; LECANDA, J.; SÁEZ, E.; FUNK, C. D. et al. Anion exchanger 2 is essential for spermiogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 26, p. 15847–15852, 2003.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E. H.; WILLIS, W. D.; BUNCH, D. O.; STRADER, L. F. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 47, p. 16501–16506, 2004.

MIYATA, H.; SATOUH, Y.; MASHIKO, D.; MUTO, M.; NOZAWA, K.; SHIBA, K.; FUJIHARA, Y et al. M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 350, n. 6259, p. 442–445, 2015.

MOMMERS, E.; KERSEMAEKERS, W. M.; ELLIESEN, J.; KEPERS, M.; APTER, D.; BEHRE, H. M.; BEYNON, J. et al. ZITZMANN, M. Male hormonal contraception: a double-blind, placebo-controlled study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 93, n. 7, p. 2572–2580, 2008.

MOORE, H. D.; HARTMAN, T. D.; PRYOR, J. P. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 310–318, 1983.

MORTIMER, S. T. CASA--practical aspects. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 515–524, 2000.

MORTIMER, S. T.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 2139–2146, 1998.

MUÑOZ-GARAY, C.; DE LA VEGA-BELTRÁN, J. L.; DELGADO, R.; LABARCA, P.; FELIX, R.; DARSZON, A. Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 234, n. 1, p. 261–274, 2001.

MURAMATSU, T.; GIRI, P. R.; HIGUCHI, S.; KINCAID, R. L. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 529–533, 1992.

NGUYEN, B. T.; FARRANT, M. T.; ANAWALT, B. D.; YUEN, F.; THIRUMALAI, A.; AMORY, J. K. et al. Acceptability of oral dimethandrolone undecanoate in a 28-day placebo-controlled trial of a hormonal male contraceptive prototype. **Contraception**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 52–57, 2020.

NOLAN, M. A.; BABCOCK, D. F.; WENNEMUTH, G.; BROWN, W.; BURTON, K. A.; MCKNIGHT, G. S. Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Ca_2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 37, p. 13483–13488, 2004.

NYA-NGATCHOU, J.-J.; AMORY, J. K. New approaches to male non-hormonal contraception. **Contraception**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 296–299, 2013.

O'BRIEN, E. D.; KRAPP, D.; CABADA, M. O.; VISCONTI, P. E.; ARRANZ, S. E. Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 350, n. 1, p. 80–88, 2011.

OKAMURA, N.; SUGITA, Y. Activation of spermatozoan adenylyl cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 258, n. 21, p. 13056–13062, 1983.

O'RAND, M. G.; SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G. Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 157, p. 105–111, 2016.

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E. Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 55, 2012.

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. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 279–285, 2009.

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E.; HAMIL, K. G.; SILVA, E. J.; RICHARDSON, R. T. Epididymal protein targets: a brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 698–704, 2011.

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E.; SIVASHANMUGAM, P.; RICHARDSON, R. T.; HALL, S. H.; FRENCH, F. S.; VANDEVOORT, C. A. et al. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 306, n. 5699, p. 1189–1190, 2004.

OSHEROFF, J. E.; VISCONTI, P. E.; VALENZUELA, J. P.; TRAVIS, A. J.; ALVAREZ, J.; KOPF, G. S. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 1017–1026, 1999.

PAYNE, C.; GOLDBERG, E. Male contraception: past, present and future. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 175–181, 2014.

PEREIRA, G. M. C.; AZIZE, R. L. Quem tomará a “pílula masculina”? Reflexões sobre a construção do usuário de contraceptivos para homens. **Sexualidad, Salud y Sociedad (Rio de Janeiro)**, [s. l.], p. 20–39, 2019.

PUGA MOLINA, L. C.; LUQUE, G. M.; BALESTRINI, P. A.; MARÍN-BRIGGILER, C. I.; ROMAROWSKI, A.; BUFFONE, M. G. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 6, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00072/full>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

QI, H.; MORAN, M. M.; NAVARRO, B.; CHONG, J. A.; KRAPIVINSKY, G.; KRAPIVINSKY, L.; KIRICHOK, Y. et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 1219–1223, 2007.

QOUBAITARY, A.; MERIGGIOLA, C.; NG, C. M.; LUMBRERAS, L.; CERPOLINI, S.; PELUSI, G. et al. Pharmacokinetics of testosterone undecanoate injected alone or in combination with norethisterone enanthate in healthy men. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 853–867, 2006.

QUILL, T. A.; SUGDEN, S. A.; ROSSI, K. L.; DOOLITTLE, L. K.; HAMMER, R. E.; GARBERS, D. L. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 25, p. 14869–14874, 2003.

RAMSEY, I. S.; RUCHTI, E.; KACZMAREK, J. S.; CLAPHAM, D. E. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 18, p. 7642–7647, 2009.

REDDY, K. V.; MEHERJI, P. K.; SHAHANI, S. K. Integrin cell adhesion molecules on human spermatozoa. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 456–463, 1998.

REN, D.; NAVARRO, B.; PEREZ, G.; JACKSON, A. C.; HSU, S.; SHI, Q. et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**, [s. l.], v. 413, n. 6856, p. 603–609, 2001.

REYNOLDS-WRIGHT, J. J.; ANDERSON, R. A. Male contraception: where are we going and where have we been? **BMJ Sexual & Reproductive Health**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 236–242, 2019.

RICHARDSON, R. T.; SIVASHANMUGAM, P.; HALL, S. H.; HAMIL, K. G.; MOORE, P. A.; RUBEN, S. M. et al. Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene**, [s. l.], v. 270, n. 1–2, p. 93–102, 2001.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.; ORGEBINCRIST, M. The Epididymis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] : Elsevier, 2006. v. 1p. 1071–1148.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. Chapter 17 - The Epididymis. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Eds.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2015. p. 691–771.

ROBERTSON, M. J.; KENT, K.; THARP, N.; NOZAWA, K.; DEAN, L.; MATHEW, M.; GRIMM, S. L. et al. Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets. **BMC Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 103, 2020.

SAKAGUCHI, D.; MIYADO, K.; IWAMOTO, T.; OKADA, H.; YOSHIDA, K.; KANG, W.; SUZUKI, M. et al. Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312897/>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

SANTI, C. M.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, P.; DE LA VEGA-BELTRÁN, J. L.; BUTLER, A.; ALISIO, A.; DARSZON, A.; SALKOFF, L. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. **FEBS letters**, [s. l.], v. 584, n. 5, p. 1041–1046, 2010.

SATOUH, Y.; INOUE, N.; IKAWA, M.; OKABE, M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 125, n. Pt 21, p. 4985–4990, 2012.

SEDGH, G.; SINGH, S.; HUSSAIN, R. Intended and unintended pregnancies worldwide in 2012 and recent trends. **Studies in Family Planning**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 301–314, 2014.

SHAN, C.; LI, H.; ZHANG, Y.; LI, Y.; CHEN, Y.; HE, W. Binding interactions of epididymal protease inhibitor and semenogelin-1: a homology modeling, docking and molecular dynamics simulation study. **PeerJ**, [s. l.], v. 7, p. e7329, 2019.

SHANG, E.; NICKERSON, H. D.; WEN, D.; WANG, X.; WOLGEMUTH, D. J. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 134, n. 19, p. 3507–3515, 2007.

SHOJI, S.; TITANI, K.; DEMAILLE, J. G.; FISCHER, E. H. Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 254, n. 14, p. 6211–6214, 1979.

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**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e82014, 2013.

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. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 56, 2012. a.

SILVA, E. J. R.; PATRÃO, M. T. C. C.; TSURUTA, J. K.; O'RAND, M. G.; AVELLAR, M. C. W. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 832–842, 2012. b.

SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive Biomedicine Online**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 28–38, 2015.

SIPILÄ, P.; BJÖRKGREN, I. Segment-specific regulation of epididymal gene expression. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 152, n. 3, p. R91-99, 2016.

SIPILÄ, P.; JALKANEN, J.; HUHTANIEMI, I. T.; POUTANEN, M. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 137, n. 3, p. 379–389, 2009.

SIVASHANMUGAM, P.; HALL, S. H.; HAMIL, K. G.; FRENCH, F. S.; O'RAND, M. G.; RICHARDSON, R. T. Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. **Gene**, [s. l.], v. 312, p. 125–134, 2003.

SKÅLHEGG, B. S.; HUANG, Y.; SU, T.; IDZERDA, R. L.; MCKNIGHT, G. S.; BURTON, K. A. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 630–639, 2002.

SMITH, G. D.; WOLF, D. P.; TRAUTMAN, K. C.; DA CRUZ E SILVA, E. F.; GREENGARD, P.; VIJAYARAGHAVAN, S. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 719–727, 1996.

SOMANATH, P. R.; JACK, S. L.; VIJAYARAGHAVAN, S. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 605–617, 2004.

SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 647–657, 2008.

SUAREZ, S. S.; HO, H.-C. Hyperactivated motility in sperm. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 119–124, 2003.

SUAREZ, S. S.; VINCENTI, L.; CEGLIA, M. W. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. **The Journal of Experimental Zoology**, [s. l.], v. 244, n. 2, p. 331–336, 1987.

SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 483–491, 2007.

SUN, X.; ZHU, Y.; WANG, L.; LIU, H.; LING, Y.; LI, Z.; SUN, L. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 65, 2017.

SUVISAARI, J.; SUNDARAM, K.; NOÉ, G.; KUMAR, N.; AGUILLAUME, C.; TSONG, Y. Y.; LÄHTEENMÄKI, P. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7 α -methyl-19-nortestosterone after intramuscular administration in healthy men. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 967–973, 1997.

TAKANO, H.; YANAGIMACHI, R.; URCH, U. A. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 79–91, 1993.

TAKESHITA, K.; SAKATA, S.; YAMASHITA, E.; FUJIWARA, Y.; KAWANABE, A.; KUROKAWA, T. et al. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 352–357, 2014.

THIRUMALAI, A.; PAGE, S. T. Recent Developments in Male Contraception. **Drugs**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 11–20, 2019.

TOURÉ, A.; LHUILLIER, P.; GOSSEN, J. A.; KUIL, C. W.; LHÔTE, D.; JÉGOU, B.; ESCALIER, D. et al. The Testis Anion Transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 16, n. 15, p. 1783–1793, 2007.

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility, and Development**, [s. l.], v. 18, n. 1–2, p. 25–38, 2006.

UHLER, M. D.; CARMICHAEL, D. F.; LEE, D. C.; CHRIVIA, J. C.; KREBS, E. G.; MCKNIGHT, G. S. Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1300–1304, 1986.

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; KOPF, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 1129–1137, 1995. a.

VISCONTI, P. E.; KRAPP, D.; DE LA VEGA-BELTRÁN, J. L.; ACEVEDO, J. J.; DARSZON, A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 395–405, 2011.

VISCONTI, P. E.; MOORE, G. D.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P.; CONNORS, S. A.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 1139–1150, 1995. b.

VYKLICKA, L.; LISHKO, P. V. Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 63, p. 154–161, 2020.

WANG, C.; FESTIN, M. P. R.; SWERDLOFF, R. S. Male Hormonal Contraception: Where Are We Now? **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, [s. l.], v. 5, p. 38–47, 2016.

WANG, D.; HU, J.; BOBULESCU, I. A.; QUILL, T. A.; MCLEROY, P.; MOE, O. W.; GARBERS, D. L. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 22, p. 9325–9330, 2007.

WASCO, W. M.; ORR, G. A. Function of calmodulin in mammalian sperm: Presence of a calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with demembranated rat caudal epididymal sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 636–642, 1984.

WAYMAN, C.; PHILLIPS, S.; LUNNY, C.; WEBB, T.; FAWCETT, L.; BAXENDALE, R.; BURGESS, G. Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. **International Journal of Impotence Research**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 216–223, 2005.

WERTHEIMER, E.; KRAPP, D.; VEGA-BELTRAN, J. L. De la; SÁNCHEZ-CÁRDENAS, C.; NAVARRETE, F.; HADDAD, D.; ESCOFFIER, J. et al. Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm *♦. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 49, p. 35307–35320, 2013.

WESTHOFF, D.; KAMP, G. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 110 (Pt 15), p. 1821–1829, 1997.

WIESNER, B.; WEINER, J.; MIDDENDORFF, R.; HAGEN, V.; KAUPP, U. B.; WEYAND, I. Cyclic Nucleotide-gated Channels on the Flagellum Control Ca²⁺ Entry into Sperm. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 142, n. 2, p. 473–484, 1998.

WU, S.; YUEN, F.; SWERDLOFF, R. S.; PAK, Y.; THIRUMALAI, A.; LIU, P. Y.; AMORY, J. K.; BAI, F. et al. Safety and Pharmacokinetics of Single-Dose Novel Oral Androgen 11β-Methyl-19-Nortestosterone-17β-Dodecylcarbonate in Men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 629–638, 2019.

XIE, F.; GARCIA, M. A.; CARLSON, A. E.; SCHUH, S. M.; BABCOCK, D. F.; JAISWAL, B. S.; GOSSEN, J. A. et al. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 296, n. 2, p. 353–362, 2006.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 371–372, 1994.

YENUGU, S.; RICHARDSON, R. T.; SIVASHANMUGAM, P.; WANG, Z.; O'RAND, M. G.; FRENCH, F. S.; HALL, S. H. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 1484–1490, 2004.

YONEMOTO, W.; MCGLONE, M. L.; GRANT, B.; TAYLOR, S. S. Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 915–925, 1997.

ZENG, H.; CHATTARJI, S.; BARBAROSIE, M.; RONDIREIG, L.; PHILPOT, B. D.; MIYAKAWA, T.; BEAR, M. F. et al. Forebrain-Specific Calcineurin Knockout Selectively Impairs Bidirectional Synaptic Plasticity and Working/Episodic-like Memory. **Cell**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 617–629, 2001.

ZENG, Y.; CLARK, E. N.; FLORMAN, H. M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 554–563, 1995.

ZHANG, H.; YU, H.; WANG, X.; ZHENG, W.; YANG, B.; PI, J.; HE, G. et al. (S)- α -Chlorohydrin Inhibits Protein Tyrosine Phosphorylation through Blocking Cyclic AMP - Protein Kinase A Pathway in Spermatozoa. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e43004, 2012.

Título do Projeto: Papel da EPPIN (Epididymal protease inhibitor) sobre a maturação pós-testicular de espermatozoides de camundongos: consequências para a função espermática

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

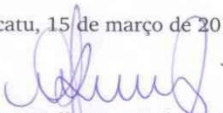


Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da EPPIN (Epididymal protease inhibitor) sobre a maturação pós-testicular de espermatozoides de camundongos: consequências para a função espermática", Protocolo nº 1141-CEUA, sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	☐ Ensino	☒ Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 20/03/2019	Término: 20/04/2021
Espécie/linhagem:	Camundongo Swiss WEBSTER (Suíço) e/ou C57BL6	
Nº de animais:	46	
Peso:	20-40 gramas	Idade: 90 a 130 dias
Sexo:	macho	
Origem	Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. CNPJ: 65.440.612/0001-40	

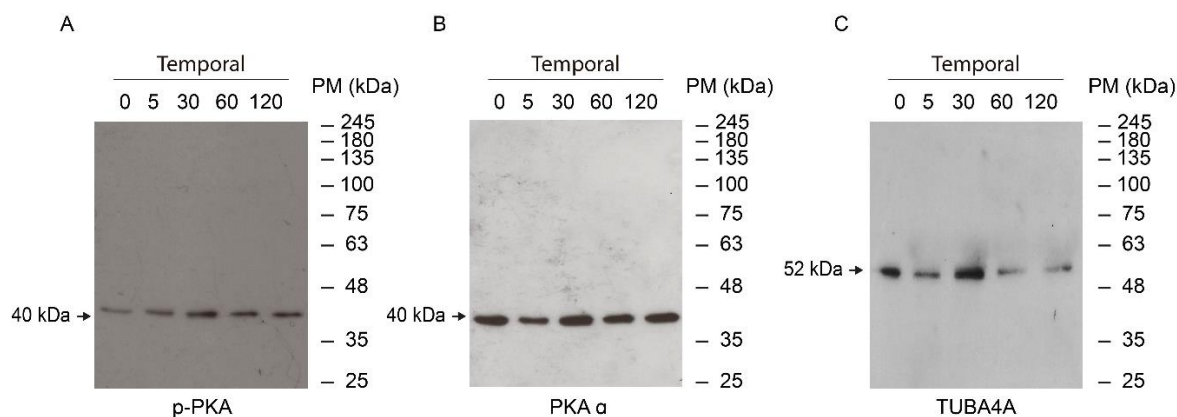
Botucatu, 15 de março de 2019.


Prof. Assoc. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP
Tel 14 3880 0851 mail: seccta@ibb.unesp.br

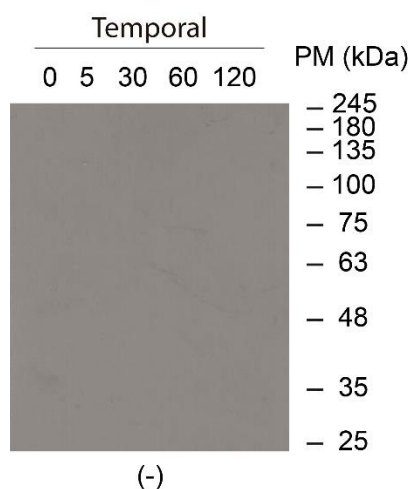


ANEXO I



Anexo I. Expressão temporal da PKA total ou fosforilada (p-PKA) em espermatozoides de camundongo como parte do resultado mostrado na Figura 6. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. Amostras dos espermatozoides (5×10^6 células/ml) foram imediatamente processadas em condições não-capacitante ou incubados em condição capacitante (5-120min) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%). As membranas foram incubadas com anticorpo **(A)** anti-PKA fosforilada ou **(B)** anti-PKA total. **(C)** TUBA4A foi utilizado como controle endógeno. As setas indicam bandas positivas imunorreativas da PKA total e fosforilada de ~40 kDa. **(D)** Controle negativo foi realizado ausência do anticorpo primário. PM indica um padrão de peso de proteínas. Resultados são representativos de 4-5 experimentos independentes.

ANEXO II



Anexo II. Controle negativo de experimentos realizados na ausência de anticorpo primário como parte dos resultados apresentados na figura 6. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo em meio TYH não-capacitante. Amostras dos espermatozoides (5×10^6 células/ml) foram imediatamente processadas em condições não-capacitante ou capacitante (5-120min) em meio suplementado com NaHCO_3 e BSA (0,75%). Controle negativo foi realizado ausência do anticorpo primário. PM indica um padrão de peso de proteínas. Resultados são representativos de 4-5 experimentos independentes.

ANEXO IV

TÍTULO II - DAS DEFESAS DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO E TESE DE DOUTORADO

ARTIGO 8º. Os prazos mínimo e máximo para a conclusão do curso de Mestrado Acadêmico no PPG-FARMATEC são de doze e vinte e quatro meses, respectivamente, a contar da data de matrícula, conforme descrito no inciso IV do Artigo 3º do Regulamento do Programa.

ARTIGO 9º. A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado deverá ser constituída de três membros titulares e três suplentes, escolhida pelo Conselho do Programa ouvida a sugestão do aluno e seu orientador.

Parágrafo único. Todos os membros titulares e suplentes devem ter titulação mínima de Doutor e produção científica compatível, sendo que pelo menos um membro titular e um membro suplente não podem pertencer ao corpo docente do Programa, bem como da unidade universitária.

ARTIGO 10º. Os prazos mínimo e máximo para conclusão do Curso de Doutorado no PPG-FARMATEC são de doze a quarenta e oito meses, respectivamente, a contar da data de matrícula, conforme descrito no inciso IV do Artigo 4º do Regulamento do Programa.

ARTIGO 11º. A Comissão Examinadora da Defesa de Tese de doutorado deverá ser constituída de cinco membros titulares e três suplentes, escolhida pelo Conselho do Programa ouvida a sugestão do aluno e seu orientador.

Parágrafo único. Todos os membros titulares e suplentes devem ter titulação mínima de Doutor e produção científica compatível, sendo que pelo menos dois membros titulares e dois membros suplentes não podem pertencer ao corpo docente do Programa, bem como da unidade universitária.

ARTIGO 12º. O aluno deverá solicitar aprovação dos nomes dos membros da Comissão Examinadora de defesa de Dissertação e Tese dentro das datas estabelecidas pelo calendário de atividades do PPGFARMATEC, anualmente atualizado pelo Conselho do Programa até sua última reunião anual, ou em prazo prévio e hábil para garantir o cumprimento dos prazos de defesa.

ARTIGO 13º. Todos os exemplares das Dissertações e Tese de acordo com o formato definido na presente instrução deverão ser entregues à Seção de Pós-Graduação nos prazos previstos pelo calendário de Atividades do PPG-FARMATEC, anualmente atualizado pelo Conselho do Programa, juntamente com o formulário de banca, devidamente preenchido e assinado pelos interessados.

§1º - O encaminhamento dos exemplares aos membros da Banca será de responsabilidade exclusiva da Seção de Pós-Graduação.

§2º - Não serão aprovadas as bancas sem o depósito dos exemplares.

§3º - Os exemplares que tratam o presente artigo devem ser encaminhados à Seção de PósGraduação em formato PDF, sendo optativa a entrega de exemplares impressos.

ARTIGO 14º. Todas as defesas de dissertação de mestrado e tese de doutorado deverão ocorrer dentro de período estabelecido em calendário de atividades do PPG-FARMATEC, anualmente atualizado pelo Conselho do Programa até sua última reunião anual.

Parágrafo único. Será permitida a defesa de dissertação de mestrado e tese de doutorado em período anterior, desde que respeitado o mínimo de três meses antes da data estabelecida no calendário de atividades do PPG-FARMATEC.

ARTIGO 15º. Na defesa de dissertação de mestrado e tese de doutorado os candidatos serão avaliados por uma banca examinadora que emitirá conceituação de “aprovado” ou “reprovado” e parecer circunstanciado, onde devem ainda constar, quando for o caso, sugestões de modificação que deverão ser incorporadas no exemplar definitivo, obedecendo-se o formato de dissertação e tese definido na presente instrução.

§1º. Será permitida a participação não presencial de um membro da banca examinadora, o qual deve emitir conceito e parecer circunstanciado em tempo hábil para ser lido pelo presidente da banca no dia da defesa de dissertação ou tese;

§2º. Serão considerados aprovados os alunos de Mestrado Acadêmico e Doutorado que obtiverem conceito de aprovado com pelo menos dois ou três membros da banca, respectivamente;

§3º. O exemplar definitivo deverá ser entregue à Seção de Pós-Graduação, no máximo após 30 dias da defesa de dissertação ou tese para homologação do resultado da defesa;

§4º. Nos casos em que não ocorram sugestões de alterações na dissertação ou tese, vale como exemplar definitivo aquele enviado para os membros da banca examinadora.

ARTIGO 16º. Casos omissos ou excepcionais serão decididos pelo Conselho do Programa.

Seção de Pós-Graduação do IBB/UNESP, aos 04 de Abril de 2016.

Aprovada em reunião do Conselho de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia realizada no dia 04 de Abril de 2016.