



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**  
**Instituto de Biociências de Botucatu**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia**

**Juliana de Jesus Andrade**

**Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a  
motilidade de espermatozoides de camundongos: repercussões para  
a função espermática e fertilidade**

**Botucatu-SP  
2020**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**  
**Instituto de Biociências de Botucatu**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia**

**Juliana de Jesus Andrade**

**Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a  
motilidade de espermatozoides de camundongos: repercussões para  
a função espermática e fertilidade**

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

Candidata: Juliana de Jesus Andrade

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

**Botucatu-SP**  
**2020**

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

Andrade, Juliana de Jesus.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Erick José Ramo da Silva

Capes: 21000000

1. Espermatozoides. 2. Proteínas de plasma seminal. 3. Motilidade espermática. 4. Camundongos como animais de laboratório.

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

## **Auxílio Financeiro**

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(Processo #2015/08227-0)

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo.

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

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

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

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

## RESUMO

Proteínas do plasma seminal possuem o importante papel de regular a função espermática, sendo fundamentais para a fertilidade masculina. Em primatas e roedores, as proteínas mais abundantes do plasma seminal são as semenogelinas (SEMG1 e SEMG2) e as SVS's (SVS2 e SVS3; *seminal vesicle-secretory proteins*), respectivamente, as quais possuem similaridades funcionais e estruturais. Essas proteínas fazem parte de uma família conhecida como REST (*Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed*), sendo abundantemente expressas pela glândula seminal de mamíferos. A SEMG1 interage com o espermatozoide ejaculado e inibe a sua motilidade, capacitação e reação acrossômica. Por sua vez, a SVS2 também inibe a capacitação e a reação acrossômica no espermatozoide murino, sendo estes efeitos inibitórios potencializados pela SVS3. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da SVS2 e SVS3 na motilidade espermática. Neste estudo, testamos a hipótese que a SVS2 inibe a motilidade espermática em camundongos, e que a SVS3 facilita esses efeitos inibitórios. Também caracterizamos o perfil de expressão e distribuição da SVS2 e SVS3 (RNAm e proteína) no sistema reprodutor de camundongos machos, bem como sua regulação por androgênios. Para isto, processamos órgãos reprodutivos para ensaios de RT-PCR, RT-qPCR, *Western blot* e imuno-histoquímica, e espermatozoides epididimários para ensaios de imunofluorescência após incubação com a SVS2 e SVS3A murinas recombinantes (SVS2m e SVS3m) ou fluído da glândula seminal. Além disso, para avaliar o impacto da SVS2m e SVS3Am sobre a motilidade espermática, incubamos espermatozoides da cauda do epidídimo com diferentes concentrações de SVS2m e SVS3m recombinantes, isoladas ou em associação, e avaliamos a motilidade pela plataforma CASA (*computer-assisted sperm analysis*). Nossos resultados demonstraram que SVS2 e SVS3 (RNAm e proteína) são diferencialmente expressos em tecidos reprodutivos de camundongos machos. Os transcritos *Svs2* e *Svs3* foram detectados na glândula seminal, mas também em outros tecidos do sistema reprodutor, como cauda do epidídimo, ducto deferente, próstata ventral, e no testículo (somente *Svs3*). Os resultados de *Western blot* revelaram a expressão da SVS2 pela presença de uma banda única, com massa molecular aparente de 45 kDa na glândula seminal (tecido e fluído). Na cauda do epidídimo, observamos a presença de uma banda menor, de ~11 kDa. Para a SVS3, observamos a presença de uma banda de 35 kDa no fluído da glândula seminal. Já em amostras de testículo, cauda do epidídimo e glândula seminal, observamos a presença de múltiplas bandas com massas moleculares aparentes de 40-43, 28-29 e 14 kDa, respectivamente. Análises de RT-qPCR e imuno-histoquímica utilizando amostras da glândula seminal de animais em diferentes fases da maturação sexual ou submetidos à orquiectomia bilateral com ou sem reposição hormonal com testosterona (8 mg/kg, s.c.) demonstraram a correlação positiva entre a expressão da SVS2 e SVS3 com os níveis plasmáticos de androgênios. Tanto a SVS2m quanto a SVS3m interagiram com espermatozoides maduros, apresentando sítios de ligação específica na cabeça e flagelo. Observamos que a SVS2m inibiu os parâmetros de motilidade e cinemática espermática de forma dependente da concentração ( $IC_{50} = \sim 5 \mu M$ ) e tempo de incubação, os quais afetaram a motilidade progressiva e hiperativada. Por outro lado, a SVS3m apresentou apenas efeitos modestos sobre a motilidade hiperativada. Em adição, a SVS3m não demonstrou efeito sinérgico sobre os efeitos inibitórios da SVS2m sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos. Em conjunto, nossos dados demonstram que a SVS2 é um fator endógeno do plasma seminal de camundongos com atividade inibitória da motilidade espermática. Considerando que a SVS2 é a ortóloga murina à SEMG1 humana, propomos a existência de mecanismos conservados para o controle da motilidade espermática a partir de proteínas oriundas do plasma seminal em primatas e roedores. Nossas descobertas abrem novas fronteiras para o estudo do papel das proteínas da família REST na regulação das funções espermáticas, principalmente nos parâmetros de motilidade espermática, bem como sua exploração como alvos para contracepção masculina, utilizando modelos murinos.

## ABSTRACT

Seminal plasma proteins play important roles on the regulation of sperm function and male fertility. In primates and rodents, the most abundant proteins in the seminal plasma are the semenogelins (SEMG1 and SEMG2) and seminal vesicle-secreted proteins (SVS2 and SVS3), respectively, which display functional and structural similarities. These proteins are members of the REST (Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed) family, which are abundantly expressed in the seminal vesicles. SEMG1 interacts with the ejaculated spermatozoa, thus inhibiting its motility, capacitation and acrosomal reaction. In turn, SVS2 inhibits capacitation and acrosome reaction in murine spermatozoa. SVS2 inhibitory effects on mouse sperm capacitation and acrosome reaction are potentiated by SVS3. However, little is known about the effects of SVS2 and SVS3 on sperm motility. In this study, we tested the hypothesis that SVS2 inhibits mouse sperm motility, and that SVS3 facilitates these inhibitory effects. We also characterized the expression and distribution profile of SVS2 and SVS3 (mRNA and protein) in the male mouse reproductive tract, as well as their regulation by androgens. We processed reproductive tissues for RT-PCR, qPCR, Western blot and immunohistochemistry assays, and epididymal spermatozoa incubated with recombinant murine SVS2 and SVS3A (SVS2m and SVS3m) or seminal vesicle fluid for immunofluorescence assays. To assess the impact of SVS2m and SVS3m on sperm motility, we incubated spermatozoa with different concentrations of recombinant SVS2m and SVS3m, isolated or in combination, and evaluated their motility parameters using the computer-assisted sperm analysis (CASA). Our results demonstrated that SVS2 and SVS3 (mRNA and protein) are differentially expressed in male mouse reproductive tissues. *Svs2* and *Svs3* transcripts were detected in the seminal vesicle, but also testis (only *Svs3*), cauda epididymis, vas deferens and ventral prostate. Western blot results revealed the expression of SVS2 by the presence of a single band, with apparent molecular mass of 45 kDa in the seminal vesicle (tissue and fluid). In cauda epididymis protein extracts, however, we observed the presence of a smaller band with apparent molecular mass of 11 kDa. For SVS3, we observed the presence of a 35-kDa-band in the seminal vesicle fluid. In testis, epididymis and seminal vesicle samples, however, we observed the presence of multiple bands with apparent molecular masses of 40-43, 28-29 and 14 kDa depending on the tissue analyzed. RT- qPCR and immunohistochemistry analyzes using seminal vesicle samples from animals at different stages of sexual maturation or subjected to bilateral orchiectomy with or without hormone replacement with testosterone (8 mg/kg, s.c.) demonstrated that both *Svs2* and *Svs3* are androgen-dependent genes. Both SVS2m and SVS3m bound to the head and flagellum of mature spermatozoa. We observed that SVS2m inhibited sperm motility and kinematics in a concentration- ( $IC_{50} = \sim 5 \mu M$ ) and time-dependent manner, thus leading to an inhibition of progressive motility and hyperactivation. On the other hand, SVS3m displayed modest effects on hyperactivated, but not progressive, motility. Furthermore, SVS3m did not demonstrate a synergistic effect on the inhibitory effects of SVS2m on mouse sperm motility. Altogether, our data demonstrate that SVS2 is a seminal plasma-derived inhibitory factor of mouse sperm motility. Since SVS2 is the murine orthologue of human SEMG1, we propose the existence of conserved mechanisms for the control of sperm motility endogenous to the seminal plasma in primates and rodents. Our findings open new frontiers for the study on the roles of REST proteins on the regulation of sperm functions, which could be explored for the development of new targets for male contraception, using murine models.

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AR: receptores de andrógenos

ACs: adenilato ciclase solúvel

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

BSA: albumina de soro bovina

CASA: computer-assisted sperm analysis, do inglês

Ct: cycle threshold, do inglês

EPPIN: Inibidor de protease epididimário

iRMI: índice de inibição relativa da motilidade

mAChR: Muscarinic acetylcholine receptors, do inglês

PKA: protein Kinase A, do inglês

Ppia: ciclofilina A

PSA: antígeno prostático específico

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

Rps18: proteína ribossomal S18

SEMG1: semenogelina-1

SEMG2: semenogelina-2

SVS1: seminal vesicle secretory protein 1, do inglês

SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês

SVS3A: seminal vesicle secretory protein 3A, do inglês

SVS3B: seminal vesicle secretory protein 3B, do inglês

SVS4: seminal vesicle secretory protein 4, do inglês

SVS5: seminal vesicle secretory protein 5, do inglês

SVS6: seminal vesicle secretory protein 6, do inglês

SVS7: seminal vesicle secretory protein 7, do inglês

TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

## Sumário

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                                                                                             | 7  |
| 1.1. Espermatozoides .....                                                                                                                                      | 7  |
| 1.2. Processos pós-testiculares de maturação espermática: aquisição de motilidade e capacidade de fertilização.....                                             | 12 |
| 1.3. Glândula seminal .....                                                                                                                                     | 16 |
| 1.4. Proteínas REST's ( <i>Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed</i> ) .....                                                                             | 18 |
| 2. Objetivos .....                                                                                                                                              | 25 |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                                                                                                        | 25 |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                                                                                                                | 25 |
| 3. Material e métodos .....                                                                                                                                     | 26 |
| 3.1. Estratégias experimentais.....                                                                                                                             | 26 |
| 3.2. Reagentes .....                                                                                                                                            | 28 |
| 3.3. Animais.....                                                                                                                                               | 30 |
| 3.4. Orquiectomia bilateral .....                                                                                                                               | 30 |
| 3.5. Coletas dos órgãos .....                                                                                                                                   | 31 |
| 3.6. Extração do RNA total.....                                                                                                                                 | 31 |
| 3.7. Reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerização em cadeia convencional (PCR) .....                                                          | 32 |
| 3.8. Ensaios de PCR em tempo real (qPCR) .....                                                                                                                  | 32 |
| 3.9. Ensaios Western blot .....                                                                                                                                 | 35 |
| 3.10. Ensaios de imuno-histoquímica.....                                                                                                                        | 36 |
| 3.11. Ensaios de Imunofluorescência.....                                                                                                                        | 37 |
| 3.12. Ensaios de análise da motilidade espermática.....                                                                                                         | 38 |
| 3.13. Análise estatística .....                                                                                                                                 | 41 |
| 4. Resultados.....                                                                                                                                              | 42 |
| 4.1. Os genes Svs2 e Svs3 são diferencialmente expressos em tecidos reprodutivos de camundongos machos.....                                                     | 42 |
| 4.2. A expressão dos genes Svs2 e Svs3 é diferencialmente regulada por androgênios na glândula seminal.....                                                     | 45 |
| 4.3. SVS2 nativa e recombinante e SVS3A recombinante interagem com espermatozoides maduros.....                                                                 | 49 |
| 4.4. SVS2 murina recombinante inibe a motilidade de espermatozoides de camundongos <i>in vitro</i> .....                                                        | 52 |
| 4.5. SVS3A murina recombinante reduz parâmetros de vigorosidade, mas não afeta a motilidade de espermatozoides de camundongos.....                              | 54 |
| 4.6. A SVS3A recombinante não possui efeito sinérgico sobre os efeitos inibitórios da SVS2 recombinante sobre a motilidade espermatozoides de camundongos ..... | 57 |
| 5. Discussão .....                                                                                                                                              | 60 |
| 6. Conclusão.....                                                                                                                                               | 70 |

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

## ***1. Introdução***

## 1. Introdução

### 1.1. Espermatozoides

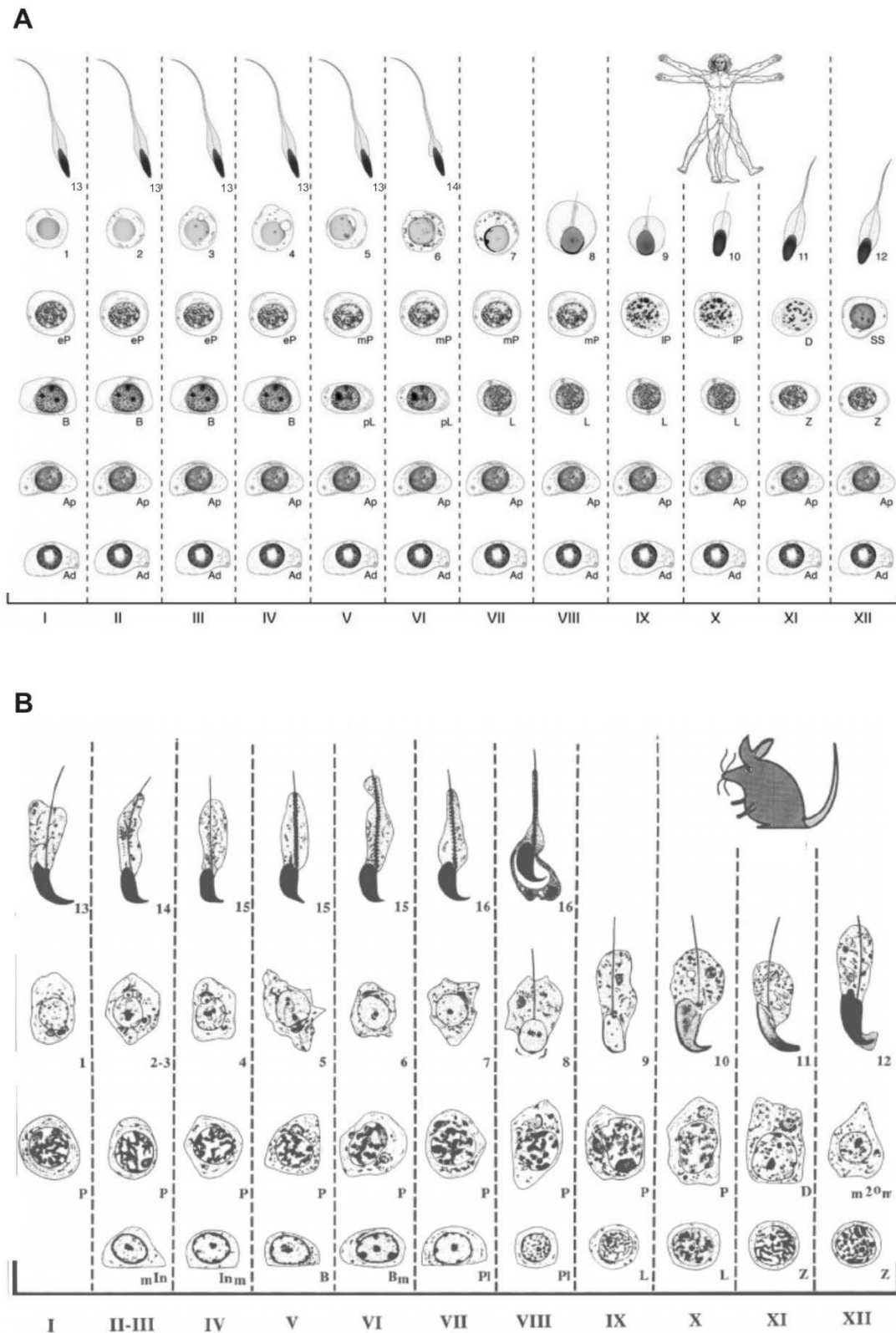
Os espermatozoides são células flageladas, altamente especializadas, que apresentam características morfológicas e funcionais únicas, as quais os tornam capazes de entregar o material genético masculino ao oócito durante a reprodução (Eddy, 2006). Em mamíferos, os espermatozoides são as únicas células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

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

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

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

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

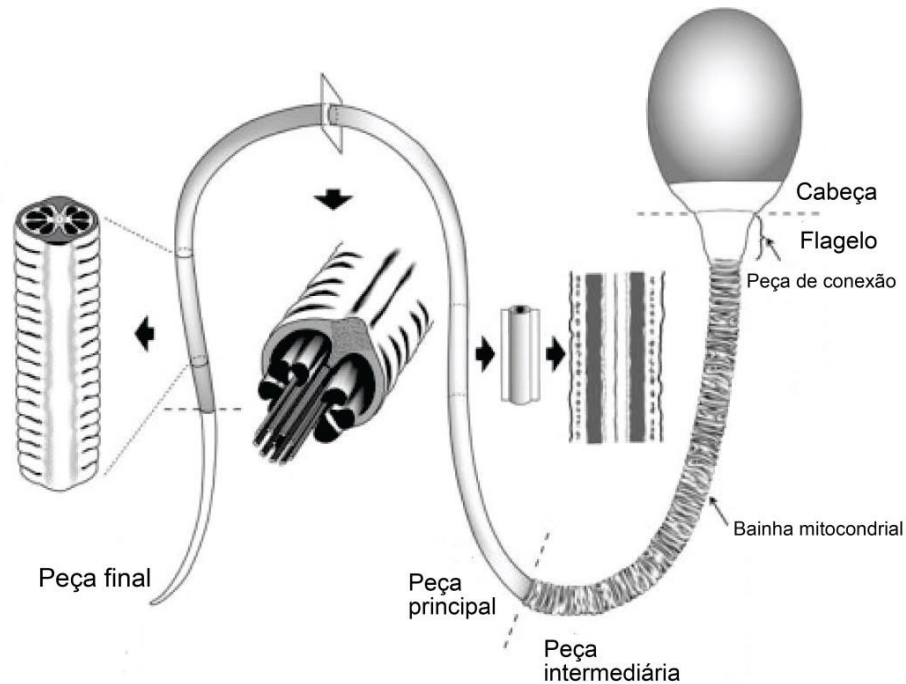


**Figura 1.** Diagrama da espermatogênese em homens (**A**) e camundongos (**B**), demonstrando os tipos de células espermatogênicas presentes em cada estágio do epitélio seminífero. Ad (espermatogônia tipo Ad – do inglês *dark*); Ap (espermatogônia tipo Ap – do inglês *pale*); B (espermatogônia tipo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

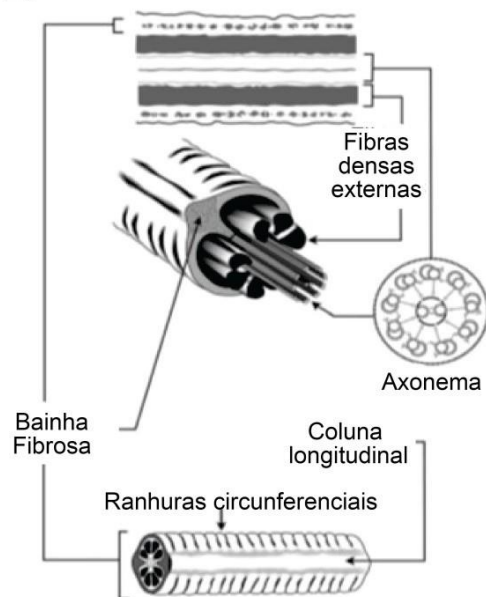
Os espermatozoides são divididos morfologicamente em dois compartimentos principais: cabeça e flagelo, separados pela peça de conexão (Figura 2A). A cabeça é dividida em região acrossômica, segmento equatorial e região pós-acrossômica (Figura 2A) (Mortimer, 2018). O acrossoma possui lisossomos e diversas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

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

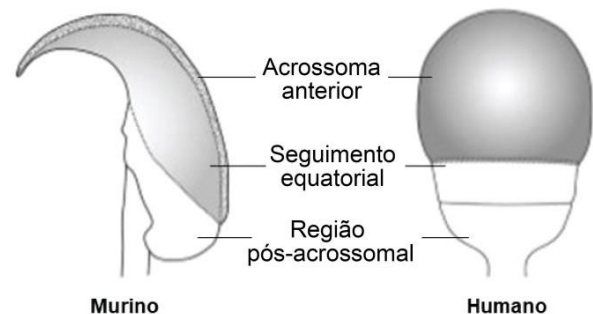
A



B



C



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

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

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

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

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

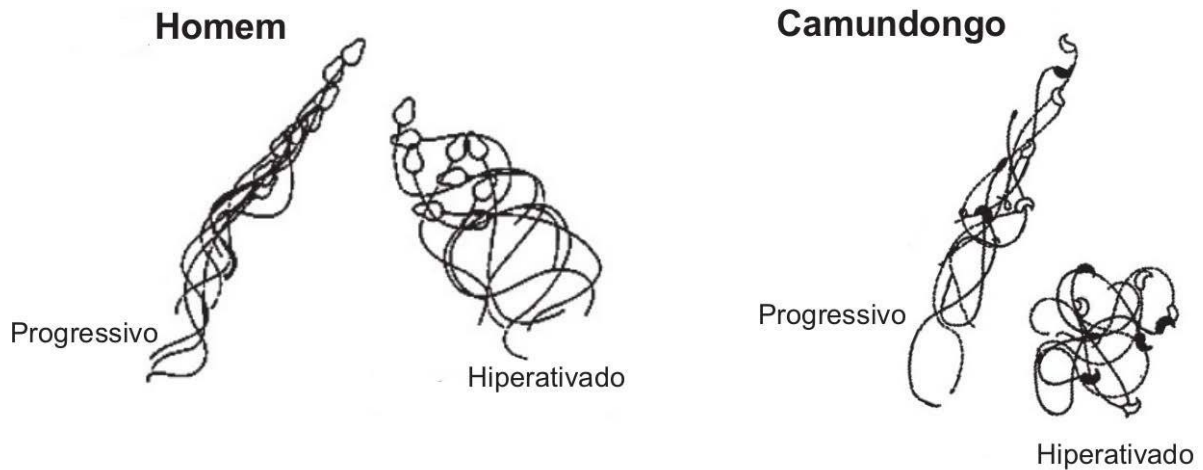
observação, primeiramente descrita por Chang (1951) e Austin (1952), foi denominada capacitação espermática. Trata-se de um evento fundamental para a fertilidade, pois confere ao espermatozoide a capacidade de sofrer reação acrossômica e fertilizar o oócito. Durante a capacitação, os espermatozoides passam por alterações fisiológicas e bioquímicas, incluindo mudanças na composição da membrana plasmática e em seu potencial elétrico, além de ativação de vias de sinalização intracelular, que culminam dentre outros efeitos na fosforilação de proteínas do citoesqueleto e de membrana (FLORMAN; DUCIBELA, 2006, p. 57). De fato, a capacitação espermática está correlacionada com, dentre outras mudanças, aumento do pH intracelular e alterações na fluidez da membrana plasmática (Visconti *et al.*, 1995; Florman & Ducibella, 2006; Ickowicz *et al.*, 2012). O aumento da fluidez da membrana plasmática é promovido pela remoção de esteróis por moléculas como a albumina (Davis, 1980). A alteração da fluidez da membrana facilita o aumento de sua permeabilidade aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), componentes importantes para a ativação da via adenilato ciclase solúvel (ACs)/adenosina monofosfato cíclico (AMPC)/proteína quinase A (PKA, do inglês, *protein kinase A*) e consequentemente a fosforilação de resíduos de serina e treonina (Davis, 1980; Visconti *et al.*, 1995; Visconti *et al.*, 2011; Aitken & Nixon, 2013). Além disso, fosforilação de resíduos de tirosina também está correlacionada à capacitação e à regulação da motilidade espermática (Visconti *et al.*, 1995; Mizrahi & Breitbart, 2014).

Sabe-se que a sinalização associada à capacitação pode ser regulada (estimulada ou inibida) por eventos mediados por interações proteína-proteína na superfície espermática, incluindo aquelas que envolvem a ligação de proteínas do plasma seminal com proteínas espermáticas. Vale ressaltar que a capacitação pode ser mimetizada *in vitro* utilizando meios de cultura apropriados, contendo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e albumina de soro bovino (BSA, do inglês bovine serum albumin), dentre outros componentes (Visconti *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2010).

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

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

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



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

Diversas proteínas espermáticas estão envolvidas na regulação da motilidade, como por exemplo, proteínas de citoesqueleto, canais iônicos e proteínas que atuam na sinalização de cálcio, metabolismo e fosforilação (Turner, 2005). Até o momento, o principal mecanismo de sinalização que regula a motilidade espermática em mamíferos envolve a ativação da ACs pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{HCO}_3^-$  e, conseqüentemente, o aumento dos níveis intracelulares de AMPc, resultando na fosforilação de resíduos de serina/treonina de proteínas do flagelo pela PKA (Suárez & Osman, 1987; Turner, 2005; Xia *et al.*, 2007). Apesar da importância da motilidade e da capacitação espermática para a reprodução, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação. Dessa forma, avançar no conhecimento sobre os fatores envolvidos no seu desencadeamento e regulação é de suma importância para o entendimento da fisiologia do espermatozoide e, conseqüentemente da fertilidade masculina (Eddy, 2006). Essas descobertas podem, por exemplo, ser exploradas para o desenvolvimento de novas terapias para infertilidade ou ainda como alvos farmacológicos para a contracepção masculina. Um ponto que merece destaque é o papel regulatório de proteínas presentes no plasma seminal, incluindo aquelas secretadas pela glândula seminal, sobre a motilidade e capacitação espermáticas.

### 1.3. Glândula seminal

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

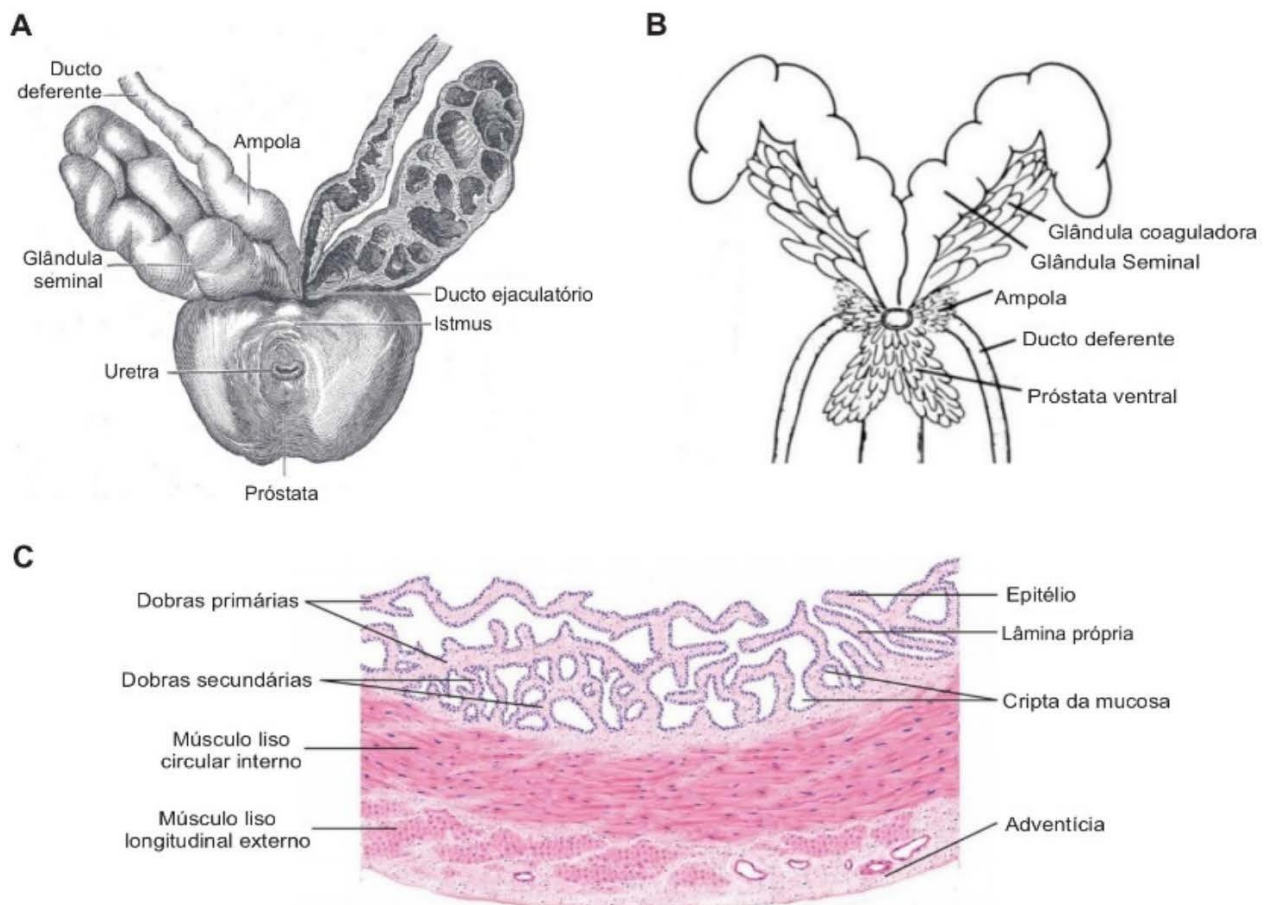
Assim como o epidídimo e o ducto deferente, a glândula seminal é derivada do ducto mesonéfrico (também conhecido como ducto de Wolff) durante o desenvolvimento embrionário. Em camundongos após o 15º dia de gestação é possível observar a expansão do epitélio distal do ducto mesonéfrico, marcando a estrutura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

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

O epitélio da glândula seminal é altamente convoluto e irregular (Figura 4C). Sua mucosa possui dobras que se ramificam em várias dobras secundárias, formando cavidades irregulares, estas dobras se estendem até a luz tubular (Figura 4C). Seu epitélio é pseudoestratificado e colunar ou cuboide e suas células epiteliais contêm grânulos secretores e núcleo basal (Eroschenko, 2013). O músculo liso da glândula seminal consiste em uma camada muscular circular interna e uma camada muscular longitudinal externa (Figura 4C). A camada adventícia circunda o músculo liso e se funde com o tecido conectivo (Figura 4C) (Eroschenko, 2013). As camadas musculares lisas são inervadas por fibras noradrenérgicas e colinérgicas. As funções da inervação autônoma na glândula seminal envolvem o controle da contratilidade da musculatura lisa e da atividade secretora do epitélio (Mendes *et al.*, 2004). No músculo liso da glândula seminal de ratos estão presentes os subtipos  $M_2$  e  $M_3$  do receptor muscarínico de acetilcolina (mAChR) (Hamamura *et al.*, 2006; Avellar *et al.*, 2009). Receptores adrenérgicos também foram detectados em células epiteliais e da musculatura lisa da glândula seminal de ratos, de forma predominantemente o receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Shima, 1992; Queiróz *et al.*, 2008). Os três subtipos de adrenoceptores- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1D}$ ) estão presentes na glândula seminal de ratos, no entanto, a contração da glândula seminal é predominantemente induzida via adrenoceptores- $\alpha_{1A}$  (Silva *et al.*, 1999).

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

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



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

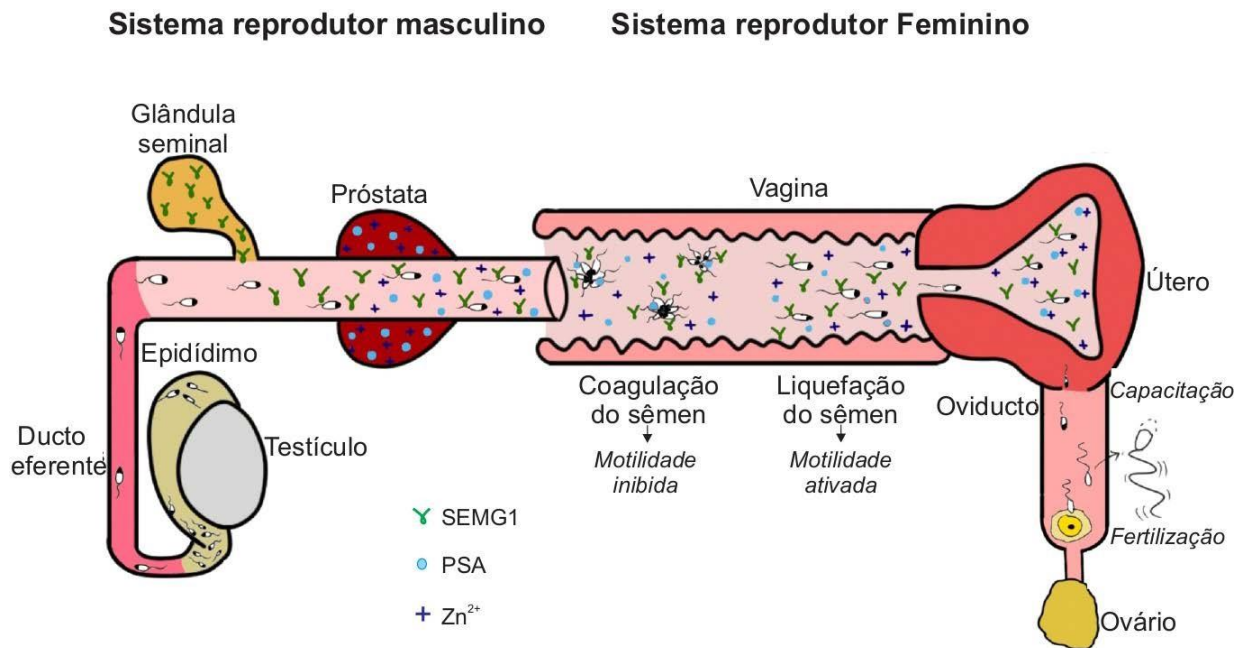
#### 1.4. Proteínas REST's (*Rapidly-evolving seminal vesicle-transcribed*)

Na maior parte dos mamíferos, incluindo roedores e primatas, as proteínas codificadas pelos genes da família REST, secretadas pela glândula seminal, são os componentes mais

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

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

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



**Figura 5:** Diagrama simplificado das funções espermáticas no sistema reprodutor masculino e feminino de mamíferos. Proteínas SEMG1, PSA e  $Zn^{2+}$  misturam-se durante a ejaculação. SEMG1 coagula o sêmen e imobiliza os espermatozoides. Diminuição da concentração de  $Zn^{2+}$  no coágulo pode ativar a PSA. PSA cliva SEMG1 e liquefaz o coágulo do sêmen ocasionando a ativação da motilidade espermática. A remoção dos fragmentos de SEMG1 da superfície dos espermatozoides permite sua capacitação e, posterior fertilização do ócito. Adaptado de Yoshida *et al.* (2008b).

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

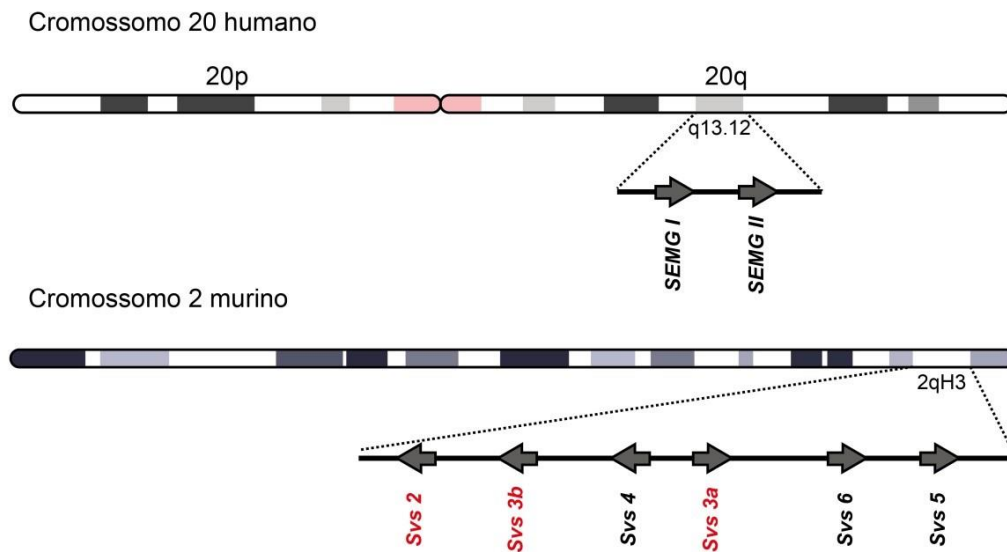
Em camundongos, os membros da família REST são as SVS's (do inglês, *seminal vesicle-secretory proteins*). Oito SVS's (SVS1, SVS2, SVS3A, SVS3B, SVS4, SVS5, SVS6 e SVS7) foram descritas no sêmen de camundongos, sendo codificadas por genes diferentes. Os genes *Svs2*, *Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5*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

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

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

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

A



B

| SEMG1 ( <i>Homo sapiens</i> ; NP_002998)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | SEMG2 ( <i>Homo sapiens</i> ; NP_002999)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <pre> 1.....20.....40.....60..... mkpniifvlslllilekqaavmgQKGGKGRLPSEFSQFPFHGGQHYSQKQKQTESRGSFSIQY .....80.....100.....120..... TYHVDANDHDQSRFSQDYDINALHKTTSKGRHLGSSQQLLNKQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHKGGK .....140.....160.....180.....200 AHRGTQNPSPQDQGNPSFGKISSQYNTTEERLNVHGLSKEQTSVSGAQKGRKQGGSSSYVLQTEEL .....220.....240.....260.....280 VANKQORETKNSHCKGHYQNVVVEEHSKSVQTSIPAHQDKLQHGSKDIFSTQDELLVYNKNOH .....300.....320.....340 QTKNLNQDQGHGRKANKISYQSSSTEERRLHYGENGVQKDVQSSSIYSQTEBKAQS.....RQITIPSSQ .....360.....380.....400 QPEHSCANKISYQSSSTEERRLHYGENGVQKDVQSSSIYSQTEKLVAG.....IQAFNPKCEFWHGEN .....420.....440.....460 AKGESGQSTNREQLLSHEQKGRHQHSGHGLDIVITEQEDDSDRHLAQHLNDRNPLFT </pre> | <pre> 1.....20.....40.....60..... mksiiifvlslllilekqaavmgQKGGKGRLPSEFSQFPFHGGQHYSQKQKQTESRGSFSIQH .....80.....100.....120..... TYHVDINDHDWTRFSQDYDINALHKTTSKGRHLGSSQQLLNKQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHKGGK .....140.....160.....180.....200 AHHGTQNPSPQDQGNPSFGKISSQYNTTEERLNVHGLSKEQTSVSGAQKGRKQGGSSSYVLQTEEL .....220.....240.....260.....280 VYVKQORETKNSHCKGHYQNVVVEEHSKSVQTSIPAHQDKLQHGSKDIFSTQDELLVYNKNOH .....300.....320.....340 QTKNLNQDQGHGRKANKISYQSSSTEERRLHYGENGVQKDVQSSSIYSQTEBKAQS.....RQITIPSSQ .....360.....380.....400 QPEHSCANKISYQSSSTEERRLHYGENGVQKDVQSSSIYSQTEKLVAG.....IQAFNPKCEFWHGEN .....420.....440.....460 AKGESGQSTNREQLLSHEQKGRHQHSGHGLDIVITEQEDDSDRHLAQHLNDRNPLFT </pre> |
| SVS2 ( <i>Mus musculus</i> ; NP_059086)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | SVS3A ( <i>Mus musculus</i> ; NP_001298043)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <pre> 1.....20.....40.....60..... mksavfvlslllilekqaavmgQYATGKNGFQSSSEGFMLGQGRLSFGIRGGSDEAAEESLFMQSQ .....80.....100.....120..... RRVYGGGGDMTQTRVSYGEHTSVKGAALGRNGQVSQKLSQESQIKSYGVTSKGLKSGGSAFGQVKS .....140.....160.....180.....200 SVSQIKSYQKLSGGQKLSGGPAFGQVKSQESQIKSYGPLESSGQLKSGGSAFGQVKS SVSQIKSYGQ .....220.....240.....260.....280 LKSGGQVKS YGQTSYGEHTSVKGAALGRNGQVSQKLSQESQIKSYGVTSKGLKSGGSAFGQVKS .....300.....320.....340 LKGFSQQTQKHKGFAMDEGMSQVRKQFSDDDLVSQKSTQQMKEEDLSQFGQQRQYQKERSQSYKGL .....360.....375 EOYRKVKVEQQRNFNPNFYFTKGGADLYQAQLKG </pre>                                                                                                                           | <pre> 1.....20.....40.....60..... mksiffvlslllilekkaagIELYAGGTRKGFHLVKTSLFIMFIGNQFLYGHKEEQEAPESIFVQTK .....80.....100.....120..... HHEYGDADAMGALSSQELTSLKEDIVPEEDELQCKSQKLSQESQIKSYGVTSKGLKSGGSAFGQVKS .....140.....160.....180.....200 LKTIGQVKSQTMKLSHGAPLKSFKARLNREDIPQVKGKRGYLAEDLAQVRQKPARVHRLKGRKRS .....220.....240.....263 RKTAAYFPQFRRRSRFYFRYFQFQELQSSVHHTKSFYPGFM.....PGRGVILYQDAFTD </pre>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

**Figura 6.** Aspectos estruturais das proteínas REST's: SEMG1 e SEMG2 humanas e SVS2 e SVS3 murinas. **(A)** Localização dos genes *SEMG1* e *SEMG2* sub-locus centromérico do cromossomo 20 humano. Os genes *Svs2*, *Svs3a* e *Svs3b* murinos estão localizados em loci ortólogos cromossomo 2, juntamente com outros genes da família *Svs*. **(B)** Sequências primárias da SEMG1 (NP\_002998), SEMG2 (NP\_002999), SVS2 (NP\_059086) e SVS3A (NP\_001298043). Os peptídeos sinais são as sequências mais conservadas entre as SEMGs humanas e SVSs murinas e estão representados em letras minúsculas cinzas. As sequências sublinhadas, em negrito, em laranja, em azul ou em vermelho representam repetições *in tandem* de sequências de aminoácidos nas suas estruturas primárias (LIN *et al.*, 2012). As sequências com realce amarelo na SEMG1 e SEMG2 representam sequências que se repetem nas suas estruturas primárias (LILJA *et al.*, 1989). O resíduo único de cisteína da SEMG1 está contornado em formato de caixa na posição 239, enquanto na SEMG2, os resíduos de cisteína estão localizados nas posições 159 e 360. O resíduo único de cisteína da SVS2 está contornado em formato de caixa na posição 97, enquanto na SVS3A, os resíduos de cisteína estão contornados em formato de caixa nas posições 98, 249 e 251.

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

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

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

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

## ***2. Objetivos***

## **2. Objetivos**

### *2.1. Objetivo geral*

Investigar o efeito *in vitro* das proteínas SVS2 e SVS3 recombinantes sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos, para entender o papel fisiológico das proteínas REST's na motilidade espermática.

### *2.2. Objetivos específicos*

- Caracterizar o perfil de expressão da SVS2 e SVS3 em tecidos do trato reprodutor de camundongos machos adultos;
- Investigar o papel dos androgênios na regulação da expressão e distribuição celular da SVS2 e SVS3;
- Avaliar o perfil de interação da SVS2 e SVS3A recombinantes com espermatozoides isolados de diferentes regiões do epidídimo de camundongos;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da SVS2 e SVS3A recombinantes sobre a motilidade de espermatozoides isolados da cauda do epidídimo de camundongos;
- Avaliar o efeito da co-incubação da SVS2 e SVS3A recombinantes com espermatozoides isolados da cauda do epidídimo de camundongos sobre sua motilidade.

### ***3. Material e Métodos***

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Estratégias experimentais

Para o desenvolvimento do trabalho, de forma sucinta, adotamos os seguintes experimentos:

(i) Ensaios de RT-PCR em órgãos reprodutivos para caracterizar o perfil de expressão dos transcritos *Svs2* e *Svs3* em tecidos reprodutivos de camundongos machos adultos;

(ii) Ensaios de *Western blot* e imuno-histoquímica nos órgãos que demonstraram expressão positiva para os transcritos *Svs2* e *Svs3* com o intuito de verificar se há expressão também a nível proteico;

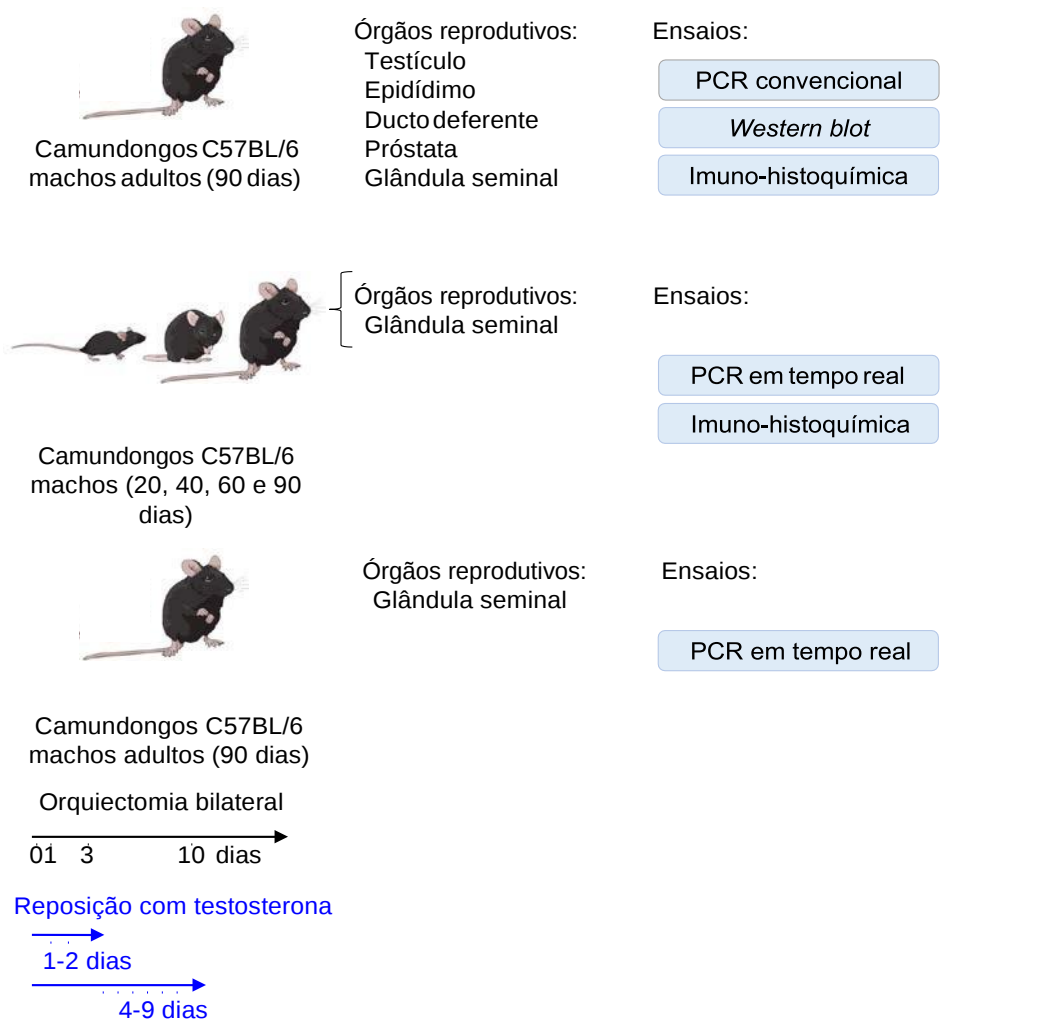
(iii) Ensaios de RT-qPCR e imuno-histoquímica em amostras de glândula seminal de camundongos em diferentes períodos do desenvolvimento (20, 40, 60 e 90 dias) e em camundongos adultos submetidos à orquiectomia bilateral com ou sem reposição hormonal com testosterona para avaliar o papel dos androgênios na expressão e distribuição celular da SVS2 e SVS3;

(iv) Ensaios de imunofluorescência para verificar o perfil de interação da SVS2 e SVS3A recombinantes em espermatozoides isolados da cauda do epidídimo de camundongos;

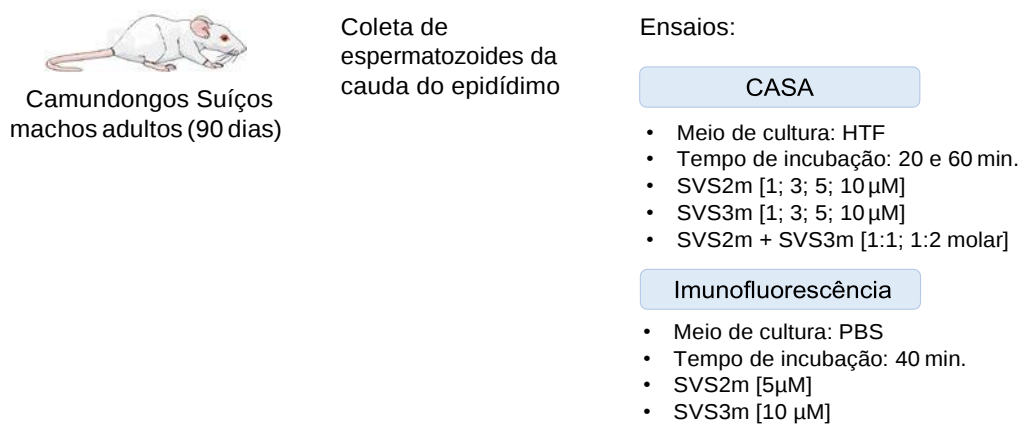
(v) Ensaios de motilidade espermática utilizando o método CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) para avaliar o efeito da SVS2 e SVS3A recombinantes, isoladamente ou em associação, sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos.

Um esquema das estratégias experimentais utilizadas nesta dissertação é apresentado na figura 7.

**Parte 1:** Caracterização do perfil de expressão e regulação androgênica da SVS2 e SVS3 no sistema reprodutor de camundongos machos.



**Parte 2:** Avaliação dos efeitos de SVS2 e/ou SVS3 recombinantes sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos.



**Figura 7.** Representação esquemática do delineamento experimental do projeto.

### 3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados para os experimentos de biologia molecular foram obtidos das empresas Sigma (Saint Louis, MO, EUA), Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, EUA) ou New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). O meio HTF (do inglês, *human tubal fluid*; cat. #90125) foi adquirido da empresa Irvine Scientific (Santa Ana, CA, EUA). Os anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de *Western blot*, imuno-histoquímica e imunofluorescência estão descritos nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Informações sobre os anticorpos primários utilizados nos ensaios de *Western blot*, imuno-histoquímica e imunofluorescência.

| Anticorpo  | Animal | Epítipo alvo                                    | Empresa         | Referência          |
|------------|--------|-------------------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Anti-SVS2  | Coelho | <sup>352</sup> RKNFNPGNYFTKGGADL <sup>368</sup> | GenScript, Inc. | Kawano et al, 2014. |
| Anti-SVS3* | Coelho | <sup>75</sup> DADADMGGALSSQE <sup>88</sup>      | GenScript, Inc. | Araki et al, 2016.  |

\*O epítipo reconhece região comum entre a SVS3A e SVS3B.

**Tabela 3.** Informações sobre os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de *Western blot*, imuno-histoquímica e imunofluorescência.

| Anticorpo                                    | Animal | Empresa                      | Catálogo    |
|----------------------------------------------|--------|------------------------------|-------------|
| Peroxidase-conjugated AffinePure Anti-rabbit | Burro  | Jackson ImmunoResearch, Inc. | 711-035-152 |
| Alexa fluor 594 – conjugated anti-rabbit     | Burro  | Jackson ImmunoResearch, Inc. | 711-585-152 |
| IgG H&L (HRP) anti-rabbit                    | Burro  | Abcam                        | ab6802      |

Para a realização dos experimentos de análise da motilidade espermática e imunofluorescência, utilizamos as proteínas murinas SVS2 e SVS3B recombinantes (SVS2m e SVS3m) expressas em sistema heterólogo de bactérias, purificadas em condição denaturante e tratadas para a remoção de endotoxinas pela empresa GenScript Inc. (Piscataway, NJ, EUA). Ambas as proteínas recombinantes foram submetidas ao processo de *refolding* e armazenadas em tampão PBS contendo 10% glicerol e 0,5 M arginina, pH 7,4. As sequências, grau de pureza e outras informações relevantes sobre a SVS2m e SVS3m estão descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Informações sobre as proteínas recombinantes SVS2 (mSVS2) e SVS3B (mSVS3) murinas utilizadas nos ensaios de imunofluorescência e análises de motilidade espermática

| Proteína                | Sequência | Vetor de clonagem | Etiqueta           | Sistema de expressão              | Concentração (mg/ml) | Pureza (%) | Nível de endotoxina (EU/mg) |
|-------------------------|-----------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------|------------|-----------------------------|
| SVS2<br>(NP_059086)     | Q32-G375  | pET-30a (+)       | 6xHis (N-terminal) | <i>E. coli</i> BL21 star<br>(DE3) | 0,64                 | ~90        | 2,2                         |
| SVS3A<br>(NP_001298043) | K28-D264  | pET-30a (+)       | 6xHis (N-terminal) | <i>E. coli</i> BL21 star<br>(DE3) | 1,38                 | ~90        | 19,8                        |

### 3.3. Animais

Camundongos C57BL/6 machos (20, 40, 60 e 90 dias de idade), provenientes da empresa Anilab, Paulínia-SP, foram utilizados para avaliar o perfil de expressão gênica da *Svs2* e *Svs3*. Camundongos Suíços machos (90 à 120 dias de idade), provenientes do Centro de Produção e Pesquisa Animal (CPPA), UNESP-Botucatu, foram utilizados para avaliar o efeito da mSVS2 e mSVS3 sobre a motilidade espermática. Camundongos Suíços foram usados nestas análises pelo fato de seus espermatozoides apresentarem altos níveis de motilidade progressiva após serem isolados do epidídimo, e motilidade hiperativada após a incubação sob condições capacitantes, quando comparados com a linhagem de camundongos C57BL/6 (Goodson *et al.*, 2011).

Mantivemos os animais no Departamento de Farmacologia do IBB/UNESP em ambiente controlado (ciclo claro/escuro de 12h e temperatura de 22 a 24°C), com livre acesso à água e ração padrão para roedores por pelo menos uma semana antes dos experimentos. Realizamos todos os procedimentos de acordo com as diretrizes para cuidado com os animais e uso de animais de laboratório, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP (processos nº 1068) (Ver anexo I).

### 3.4. Orquiectomia bilateral

Camundongos C57BL/6 adultos foram anestesiados com quetamina/xilazina (60/20 mg/kg, i.p.), e, em seguida, realizamos incisão longitudinal na zona mediana do escroto sob condições assépticas. Um dos testículos foi exteriorizado, o pedículo vascular e os ductos eferentes foram ligados com fio de algodão e seccionados. O mesmo procedimento foi repetido com o testículo contralateral. Após a remoção das gônadas, as estruturas adjacentes foram devolvidas ao interior do escroto e a incisão suturada com fio de algodão. Os animais foram eutanasiados 1, 3 e 10 dias após o procedimento. O grupo controle consistiu de animais que não foram submetidos à orquiectomia bilateral. Dois grupos adicionais de camundongos foram submetidos ao processo de orquiectomia bilateral e, em seguida, submetidos à terapia de reposição hormonal com propionato de testosterona (8 mg/kg, via subcutânea), conforme os

seguintes esquemas: 1) reposição hormonal diária a partir 1º dia pós-orquiectomia e eutanásia no 3º dia; e 2) reposição hormonal diária a partir 4º dia pós-orquiectomia e eutanásia no 10º dia. Os tratamentos foram baseados na metodologia descrita por Mendes *et al.* (2004).

### 3.5. Coletas dos órgãos

Os camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados por overdose de isoflurano por via inalatória, seguido de deslocamento cervical para a confirmação da morte do animal. Em seguida, os órgãos reprodutivos: testículos, epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), ducto deferente glândula seminal e próstata ventral foram dissecados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o processamento ou imersos em solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,4) para o processamento histológico em paraplast.

### 3.6. Extração do RNA total

Extraímos o RNA total dos órgãos citados acima com o reagente de TRIzol® (Life Technologies), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, homogeneizamos as amostras em reagente de TRIzol® com o auxílio de um homogeneizador Polytron (PT 1300 D, Kinematica). Em seguida, centrifugamos (10.000 x g, 10 min), adicionamos clorofórmio e homogeneizamos as amostras em vórtex. Após 10 min de incubação e outra centrifugação (10000 x g, 15 min), coletamos a fase aquosa superior contendo RNA total, que foi precipitado com o isopropanol e lavado com etanol 75% (v/v). O RNA total foi ressuspendido em 10-50 µl de água livre de nucleases tratada com DEPC. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro para determinar a concentração de RNA e seu grau de pureza através da relação A260/A280. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, SYBR™ Safe (Invitrogen, cat. #S33102) tampão TBE 1x e corrida de 1h a 100V (0,6-0,7 Amp), utilizando 1µg de RNA. Dessa maneira, determinamos a integridade do RNA por observação das bandas correspondentes a 28S e 18S (rRNA).

Amostras que não apresentaram bandas 18S e 28S íntegras e bem definidas, e relação A260/280 <1,7, foram descartadas.

### *3.7. Reação de transcriptase reversa e reação de polimerização em cadeia convencional (RT-PCR)*

A síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total (2,5 µg) foi realizada com o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Thermo-Fisher Scientific, cat. #11146-016), conforme as instruções do fabricante. Reações na ausência de transcriptase reversa foram realizadas como controle negativo para avaliar possível contaminação com DNA genômico das amostras analisadas. Para os ensaios de PCR, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos transcritos *Svs2*, *Svs3* e *Ppia* (ciclofilina A), utilizada como controle endógeno (Tabela 5). Os ensaios de PCR foram realizados pela adição de alíquotas de cDNA (250 ng) ao tampão de PCR contendo MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), oligonucleotídeo iniciador senso e anti-senso dos genes alvos (0,4 µM cada) e Taq DNA polimerase (1 U) em volume final de 20 µl. As condições do PCR foram: 95°C/1min, seguido de 95°C/1min – 60°C/1min – 72°C/1min por 30 ciclos (*Svs2*, *Svs3* e *Ppia*), e uma extensão final de 72°C/3min. Os produtos de DNA resultantes foram misturados com o tampão de carregamento SYBR® Safe DNA gel stain e aplicados em gel de agarose (1,5%) preparado com tampão TBE. Após a eletroforese, os resultados foram documentados no fotodocumentador GBOX® Chemi XRQ (Syngene).

### *3.8. Ensaios de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) em tempo real*

Sintetizamos cDNA a partir de amostras de RNA total (2,5 µg) usando o kit Maxima First Strand cDNA Synthesis com dsDNase (Thermo-Fisher Scientific, cat. #K1671), conforme as instruções do fabricante. Os experimentos de qPCR foram realizados em duplicata, com controles negativos consistindo de ausência de cDNA, utilizando o termociclador QuantStudio 3™ (AppliedBiosystems). Utilizamos o kit Luna SYBR Green Master Mix Universa (New England Biolabs, cat. #M300L) para análises de expressão relativa. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados para avaliar os níveis relativos dos transcritos *Svs2* e *Svs3* na glândula seminal de

camundongos em diferentes fases da maturação sexual (20, 40, 60 e 90 dias de idade) ou submetidos à orquiectomia bilateral com ou sem reposição hormonal, utilizando os transcritos *Rps18* (proteína ribossomal S18), *Ppia* (ciclofilina A) e *Hprt1* (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase 1) como controles endógenos (Tabela 5). Os cDNAs (0,2-5 ng/reacção) foram amplificados em reacções contendo 25-100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 5), nas seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação em 95°C/15 s e anelamento em 60° C/1 min. A análise da curva de dissociação foi realizada ao final de cada reacção para controle de qualidade. O valor de Ct (do inglês, *cycle threshold*) e a eficiência de cada reacção foram determinados de acordo com os algoritmos do sistema utilizado. A expressão relativa de cada transcrito (*Svs2* e *Svs3*) foi normalizada pela média aritmética dos valores de Ct dos três controles endógenos e determinada conforme a metodologia descrita por Pfaffl (2001), que utiliza a eficiência de amplificação de cada par de oligonucleotídeo iniciador determinada experimentalmente.

**Tabela 5.** Informações sobre os oligonucleotídeos iniciadores usados nos ensaios de RT-PCR e RT-qPCR

| Transcrito    | Nº de<br>acesso no<br>NCBI | Sentido | Sequência (5'-3')     | Eficiência da<br>amplificação | Concentração | Amplicon<br>(bp) | Concentra-<br>ção cDNA<br>(RT-qPCR) |
|---------------|----------------------------|---------|-----------------------|-------------------------------|--------------|------------------|-------------------------------------|
| <i>Svs2</i>   | NM_017390                  | +       | tggttgacaatatggggct   | 90%                           | 25 nM        | 192              | 0,2 ng                              |
|               |                            | -       | cacgtgtctgggtcatgtca  |                               |              |                  |                                     |
| <i>Svs3*</i>  | NM_021363                  | +       | cacatttagaggagtcaccag | 100%                          | 25 nM        | 187              | 0,5 ng                              |
|               | NM_173377                  | -       | gcaactgatgtcaagaaggc  |                               |              |                  |                                     |
| <i>Svs3**</i> | NM_021363                  | +       | agccagttcctctatgggcac | _____                         | 20 µM        | 723              | _____                               |
|               | NM_173377                  | -       | cacaagtctggtgactcctct | _____                         | 20 µM        |                  |                                     |
| <i>Rps18</i>  | NM_011296                  | +       | gttcgccagaatgaagcttct | 104%                          | 100 nM       | 207              | 5 ng                                |
|               |                            | -       | tactgtcgtgggttctgcat  |                               |              |                  |                                     |
| <i>Ppia</i>   | NM_008907                  | +       | gtctccttcgagctgtttgc  | 97%                           | 100 nM       | 150              | 5 ng                                |
|               |                            | -       | gcgtgtaaagtcaccaccct  |                               |              |                  |                                     |
| <i>Hprt1</i>  | NM_013556                  | +       | tccattcctatgactgtaga  | 107%                          | 25 nM        | 90               | 5 ng                                |
|               |                            | -       | atcatctccaccaataactt  |                               |              |                  |                                     |

\*Oligonucleotídeos iniciadores amplificam região comum dos transcritos *Svs3a* e *Svs3b*.

\*\* Oligonucleotídeos utilizados somente para RT- PCR convencional.

### 3.9. Ensaios Western blot

Experimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2010). Preparamos extratos proteicos totais dos órgãos com expressão positiva dos transcritos *Svs2* e *Svs3a* usando tampão de lise RIPA [(Nonidet P-40 a 1% v/v, SDS a 0,5% v/v e deoxicolato de sódio a 0,1% m/v) em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9,1 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,7 mM e NaCl 150 mM, pH 7,4)] contendo coquetel de inibidores de protease (Sigma, cat. #P8340, 1:100). Adicionalmente, coletamos o fluido da glândula seminal de camundongos e o processamos para isolar a fração solúvel em tampão fosfato. Determinamos a concentração de proteínas totais utilizando o método de Bradford (Micro-Rad Protein Assay, cat. #500- 0006) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Separamos extratos de proteínas totais (50-75 µg para cauda do epidídimo e glândula seminal e 15-20 µg para o fluido da glândula seminal) em eletroforese por gel de acrilamida 4-12% em sistema NuPage Bis-Tris (Invitrogen, cat. #NP0321BOX) a 200 V por 25 min, utilizando tampão de corrida (Thermo Fisher Scientific, cat. #NP0002). Em seguida, transferimos as proteínas do gel para membrana de PVDF em sistema de transferência semi- seco *Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, cat. #170-3940) a 15 V por 1 h, utilizando tampão de transferência (Thermo Fisher Scientific, cat. #NP0006). Verificamos a conformidade da transferência por coloração da membrana com solução de amido black 0,1% por 2 min.

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 5% de leite desnatado (m/v)] por 1,5 h em temperatura ambiente. Em seguida, lavamos as membranas com tampão TBS-T e incubamos com anticorpo anti-SVS2 (0,2 µg/ml para fluido da vesícula seminal e 0,3 µg/ml para tecidos) ou anticorpo anti-SVS3 (0,2 µg/ml para fluido da vesícula seminal e demais tecidos) diluídos em solução de bloqueio por 2 h. Após lavagem com tampão TBS-T, incubamos as membranas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (6 ng/ml; Tabela 2) diluídos em solução de bloqueio por 1 h. Após nova lavagem com tampão TBS-T, submetemos as membranas para a revelação das bandas

imunorreativas com reagente Luminol Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, cat. #34095), utilizando o sistema fotodocumentador G-BOX (SYNGENE). Ensaios de controle negativo para os anticorpos anti-SVS2 e anti-SVS3 foram realizados na presença dos anticorpos primários pré-adsorvidos com 30 vezes o excesso molar de peptídeo bloqueador ou ausência de anticorpo primário.

### 3.10. Ensaios de imuno-histoquímica

Fixamos a glândula seminal de camundongos de 20, 40, 60 e 90 dias em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,4 mM, NaCl 150 mM) pH 7,4 por 24 h. Em seguida, lavamos os órgãos em água corrente e os mantivemos em álcool 70% a 4°C até as próximas etapas do processamento histológico. Após o processamento para inclusão em Paraplast (McCormick, cat. #39502004), seccionamos os blocos (4  $\mu\text{m}$ ) em micrótomo e utilizamos as secções nos ensaios de imuno-histoquímica.

Realizamos os ensaios de imuno-histoquímica conforme descrito por Silva *et al.* (2012b), com algumas modificações. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas ao protocolo de recuperação antigênica por incubação com tampão citrato (citrato de sódio 10 mM, Tween-20 0,05% v/v) pH 6,0 por 15 min sob fervura em micro-ondas. Após lavagem em tampão fosfato pH 7,4, incubamos as lâminas em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%:Metanol (1:2, v/v) por 30 min a temperatura ambiente, sob proteção da luz, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, incubamos as lâminas em tampão fosfato por 5 min e solução de bloqueio (BSA 3%, m/v em tampão fosfato) por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagem em tampão fosfato, incubamos as lâminas com os anticorpos primários anti-SVS2 e anti-SVS3 (ambos 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ) diluídos em solução bloqueio a 4°C em câmara escura e úmida durante a noite. Ao término da incubação lavamos as lâminas com tampão fosfato e incubamos com solução de bloqueio por 15 min e com anticorpo secundário específico conjugado com biotina (4  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 2) por 30 min em temperatura ambiente. Utilizamos o sistema Vectastain Standard ABC (Vector, cat. #K-6105) para evidenciar o imunocomplexo formado pelo anticorpo secundário anti-coelho ligado ao anticorpo primário, de acordo com protocolo sugerido pelo

fabricante. Em seguida, lavamos as lâminas e revelamos com solução de diamino-benzidina (DAB, Vector, cat. #SK-4100) por 10 min. Contracoramos as lâminas com hematoxilina, desidratamos e montamos em Permount (Fisher Sci., cat. #S70104). Realizamos o controle negativo com anticorpos primários pré-adsorvidos com 30 vezes o excesso molar de peptídeo bloqueador ou ausência de anticorpo primário. Analisamos os resultados em microscópio Olympus Cover-018, capturamos as imagens por câmera digital e editamos as imagens capturadas com programa de documentação e edição de imagem para ajuste de brilho e contraste nos softwares Adobe Photoshop v.12.1.

### *3.11. Ensaios de Imunofluorescência*

Dissecamos a cauda do epidídimo de camundongos e a incubamos em tampão fosfato (NaCl 130 mM, KCl 2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,4 mM, pH 7,4) pré-aquecido 37°C. Em seguida, cortamos a cauda do epidídimo com tesoura para permitir a saída dos espermatozoides. Após 10 min de incubação a 37°C ( $\text{CO}_2$  5%/ar 95%), removemos a cauda do epidídimo, lavamos os espermatozoides com tampão fosfato por 2 vezes (500 x g, 10 min), e realizamos a contagem espermática em câmara de Neubauer. Diluímos a suspensão de espermatozoides para  $4,0 \times 10^6$  células/ml, lavamos os espermatozoides em tampão fosfato (500 x g, 10 min) e os incubamos por 40 min a 37°C ( $\text{CO}_2$  5%/ar 95%) na ausência ou presença de: 1) fração solúvel do fluido da glândula seminal; ou 2) proteínas recombinantes mSVS2 ou mSVS3 5  $\mu\text{M}$ . Após duas lavagens dos espermatozoides com tampão fosfato (500 x g, 10 min) e preparamos esfregaços em lâminas silanizadas. Após secagem, fixamos os esfregaços em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 30 min e incubamos com solução bloqueio contendo BSA 1% em tampão fosfato suplementado com saponina 0,02% por 60 min. Os esfregaços foram incubados com anticorpos anti-SVS2 (0,4  $\mu\text{g/ml}$ ) ou anti-SVS3 (0,4  $\mu\text{g/ml}$ ) diluídos em solução bloqueio a 4°C em câmara escura e úmida durante a noite (16-18 horas). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fluoróforo Alexa flúor 594 (7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabela 2) por 1 h. Em seguida incubamos as lâminas com solução de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI,

Invitrogen, cat. #D1306) para marcação dos núcleos celulares. Após lavagem com tampão fosfato sob proteção da luz, montamos as lâminas com Prolong Gold (Molecular Probes, cat. #P36930) e utilizamos esmalte para selagem. Os controles negativos foram realizados com anticorpos primários pré-adsorvidos com 30 vezes o excesso molar de peptídeo bloqueador ou ausência de anticorpo primário. As imagens foram documentadas usando o microscópio Leica DM 4500B com filtros de excitação apropriados. As imagens finais foram escolhidas para representar o padrão de coloração positiva para SVS2 e SVS3 observada rotineiramente em experimentos de imunofluorescência e submetidas aos mesmos ajustes de brilho / contraste usando o software ImageJ (Rueden *et al.*, 2017).

### 3.12. Ensaios de análise da motilidade espermática

Realizamos a análise da motilidade de espermatozoides isolados da cauda do epidídimo de camundongos adultos suíços utilizando a tecnologia CASA (do inglês, *computer-assisted sperm analysis*). Utilizamos o sistema CASA CEROS II (Hamilton-Thorne, Beverly, MA, EUA), seguindo protocolo descrito por Goodson *et al.* (2011).

Para esses ensaios, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, visto que a utilização de anestésicos pode interferir na motilidade espermática (Stutler *et al.*, 2007). Dissecamos a cauda do epidídimo e a transferimos para placa de cultura de 6 poços contendo meio HTF suplementado com BSA 0,75% (v/v) pré-aquecido a 37°C. Cortamos os tecidos com tesoura para permitir a saída dos espermatozoides para o meio. Após 10 min de incubação a 37°C (CO<sub>2</sub> 5%/ar 95%), removemos os fragmentos de tecido e diluímos as alíquotas da suspensão de espermatozoides para concentração final de  $\sim 2,5 \times 10^5$  células/ml, gerando 20 a 40 espermatozoides por campo no CASA. Incubamos os espermatozoides em meio HTF na ausência ou presença de diferentes concentrações de SVS2m ou SVS3m (1, 3, 5 e 10  $\mu$ M) previamente dialisadas contra meio HTF a 37°C (CO<sub>2</sub> 5%/ar 95%). Em outro grupo de experimentos, realizamos a incubação dos espermatozoides com ambas as proteínas em relação molar de 1:1 (SVS2m 5  $\mu$ M e SVS3m 5  $\mu$ M) ou 1:2 (SVS2m 5  $\mu$ M e SVS3m 10  $\mu$ M) sob

as mesmas condições. As análises da motilidade espermática foram realizadas após 20 e 60 min de incubação.

Para tal, alíquotas de 17  $\mu\text{l}$  da suspensão de espermatozoides foram colocadas em lâminas de 80  $\mu\text{m}$  2XCELL (Hamilton Thorne) previamente aquecidas a 37°C em sistema miniTherm (Hamilton Thorne). Os traçados dos espermatozoides foram capturados com aquisição de taxa de quadros de 60 Hz por 1,5 s (90 quadros capturados) e objetiva de contraste de fase negativa de 4X (Olympus DX21). Registramos pelo menos 200 espermatozoides em 10 campos para cada amostra analisada. Os vídeos gerados foram analisados por sistema *playback* para reconstrução das trajetórias e remoção manual de trajetos de espermatozoides com colisões ou falso-negativos. Registramos as trajetórias e os parâmetros cinemáticos individualmente e removemos os trajetos espermáticos com menos de 45 pontos (50%) de aquisição. Os espermatozoides foram classificados como móveis, progressivos ( $\text{VAP} \geq 50 \mu\text{m/s}$  e  $\text{STR} \geq 50\%$ ), lentos ( $\text{VAP} \leq 10 \mu\text{m/s}$  e  $\text{VSL} \leq 30 \mu\text{m/s}$ ) e estáticos. Motilidade hiperativada foi considerada quando os espermatozoides apresentaram  $\text{VCL} \geq 180 \mu\text{m/s}$ ,  $\text{LIN} < 23,6\%$  e  $\text{ALH} \geq 9,5 \mu\text{m}$  (Kawano *et al.*, 2014). Avaliamos os seguintes parâmetros cinemáticos dos espermatozoides: velocidade média do trajeto (VAP;  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), velocidade linear (VSL;  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), velocidade curvilínea (VCL;  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH;  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), retilinearidade (STR;% ) e linearidade (LIN;% ) (Tabela 6). Por fim, calculamos o índice de inibição relativa da motilidade (iRMI) pela fórmula ( $\% \text{motilidade} \times \text{VSL}$ ), o qual foi normalizado pelo iRMI da amostra referência (HTF) para cada tempo de análise (Silva *et al.*, 2013).

**Tabela 6.** Parâmetros de cinemática espermática analisados pelo sistema CEROS II – CASA.

| Parâmetro                                                         | Definição*                                                                                                                                         | Tipo de movimento |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Velocidade média da trajetória (VAP; $\mu\text{m/s}$ )            | Velocidade da trajetória média do espermatozoide.                                                                                                  | Progressivo       |
| Velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$ )             | Velocidade média tomando como ponto de partida o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide.                                        | Progressivo       |
| Velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$ )                     | Velocidade da trajetória real do espermatozoide. Considerada a maior dentre as três velocidades e serve como elemento de cálculo para linearidade. | Vigoroso          |
| Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH; $\mu\text{m}$ ) | Amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.                                                                | Vigoroso          |
| Retilinearidade (STR; %)                                          | Relação percentual entre VSL e VAP. Parâmetro que estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.                                     | Progressivo       |
| Linearidade (LIN); %)                                             | Relação percentual entre VSL e VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade.                | Vigoroso          |

\*Segundo Verstegen *et al.* (2002).

### 3.13. *Análise estatística*

Expressamos os resultados como média  $\pm$  erro padrão da média. 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 homoscedasticidade dos dados. As diferenças estatísticas entre dois grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student, enquanto as diferenças entre mais de dois grupos foram analisadas pela variância de uma via (ANOVA). Para as análises dos dados de RT-qPCR utilizamos o pós-teste de Bonferroni, enquanto que para as análises dos dados de motilidade espermática utilizamos o pós-teste de Tukey. 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).

## ***4. Resultados***

## 4. Resultados

### Capítulo 1

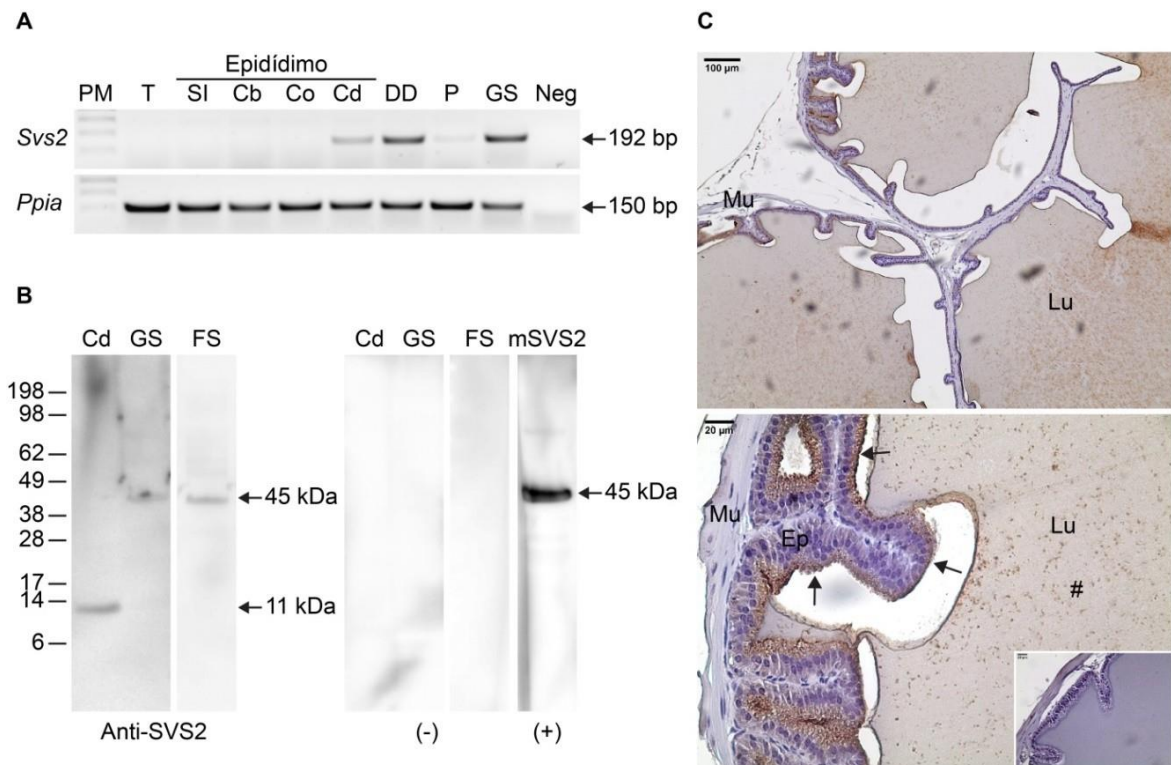
#### ***Perfil de expressão dos genes Svs2 e Svs3 no trato reprodutivo de camundongos machos em diferentes estágios da vida pós-natal***

##### ***4.1. Os genes Svs2 e Svs3 são diferencialmente expressos em tecidos reprodutivos de camundongos machos.***

Caracterizamos o perfil de expressão dos genes *Svs2* e *Svs3* (*Svs3a* e *Svs3b*) no sistema reprodutor masculino de camundongos adultos C57BL/6 por ensaios de RT-PCR, *Western blot* e imuno- histoquímica. A análise dos RT-PCR revelou expressão abundante do transcrito *Svs2* (192 pb) na glândula seminal (Figura 8A). Além disso, também identificamos esse transcrito na cauda do epidídimo, ducto deferente e, em baixa abundância, na próstata ventral (Figura 8A). Não observamos o transcrito *Svs2* no testículo e em outras regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça e corpo) (Figura 8A). Nenhum produto de PCR foi detectado quando a transcriptase reversa foi omitida das reações, demonstrando a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 8A).

Análises de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-SVS2 e extratos proteicos totais da glândula seminal e cauda do epidídimo revelaram a presença de bandas imunorreativas de diferentes massas moleculares aparentes, conforme o órgão analisado (Figura 8B). A capacidade do anticorpo anti-SVS2 de detectar a SVS2 murina foi confirmada pela presença de uma única banda com aparente massa molecular de ~45 kDa correspondente a SVS2 murina recombinante (SVS2m), utilizada como controle positivo (Figura 8B). Na glândula seminal (tecido e fluido), detectamos uma única banda imunorreativa com massa molecular aparente de ~45 kDa correspondente ao esperado para a SVS2 inteira (~41 kDa) (Figura 8B). Na cauda do epidídimo, por outro lado, observamos uma única banda imunorreativa com massa molecular aparente de ~11 kDa (Figura 8B). Além disso, não detectamos bandas imunorreativas quando as membranas foram incubadas com o anticorpo primário pré-adsorvido com o peptídeo bloqueador, utilizado como controle negativo (Figura 8B).

Os ensaios de imuno-histoquímica usando secções histológicas da glândula seminal revelaram imunomarcacção positiva para SVS2 no compartimento apical das células epiteliais nas curvaturas da mucosa primária e secundária, bem como no compartimento luminal (Figura 8C). Não observamos sinais evidentes positivos de imunomarcações de SVS2 em células do músculo liso (Figura 8C). A imunomarcacção positiva para SVS2 foi bloqueada após a incubação das amostras com anticorpo primário pré-adsorvido com peptídeo bloqueador (Figura 8C; inserto).



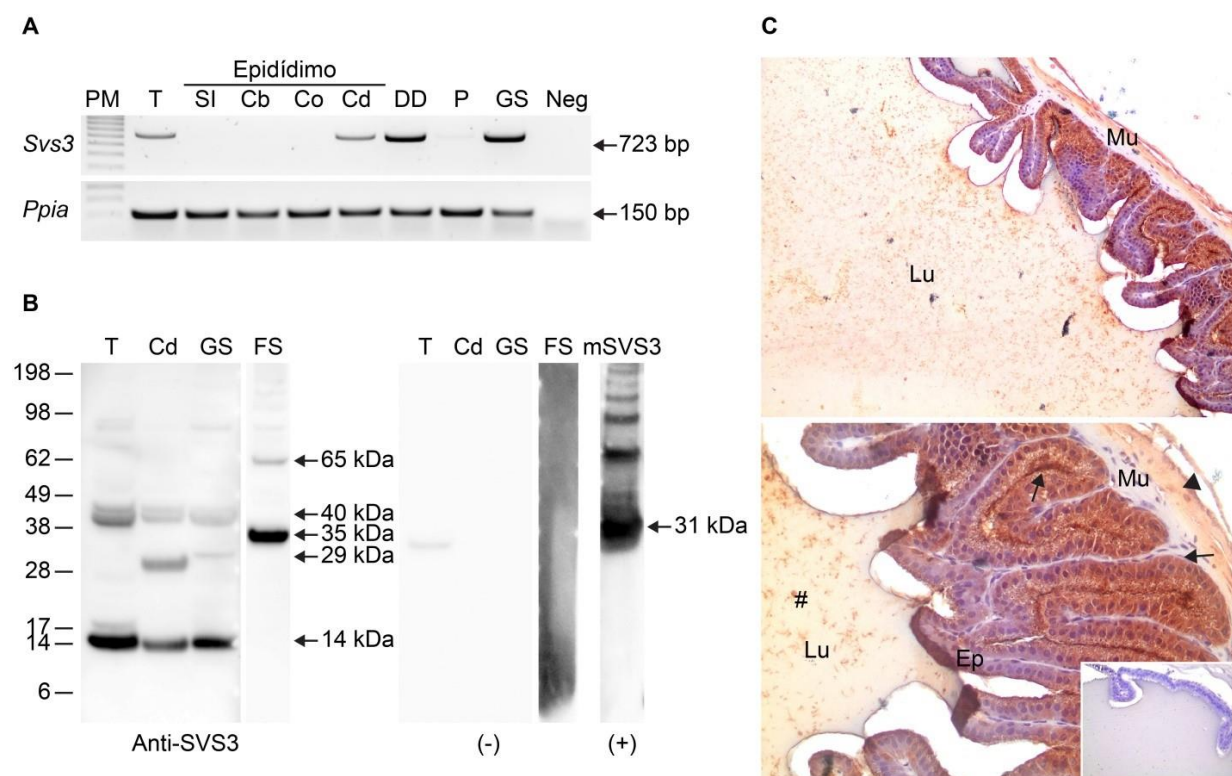
**Figura 8.** Perfil de expressão de SVS2 em tecidos reprodutivos de camundongos adultos. **(A)** Imagem invertida de gel de agarose mostrando a detecção de RNAm de *Svs2* por RT-PCR no testículo (T), epidídimo (segmento inicial, SI; cabeça, Cb; Corpo, Co; cauda, Cd), ducto deferente (DD), próstata ventral (P) e glândula seminal (GS). RNAm *Ppia* foi usado como controle endógeno. PM indica uma escala padrão de 100 pares de bases (pb). Controle negativo foi realizado na ausência de cDNA (Neg). **(B)** Detecção de SVS2 por análises de Western blot usando extrato de proteína total de cada tecido indicado. SVS2 murina recombinante foi usada como controle positivo. Principais bandas imunorreativas de SVS2 são indicadas (setas à direita). PM indica escala padrão de proteína (kDa). Controle negativo foi realizado com anticorpo primário pré-adsorvido com peptídeo bloqueador. **(C)** Localização de SVS2 por imuno-histoquímica em tecidos da glândula seminal de camundongos adultos. Controle negativo foi realizado utilizando o anticorpo primário pré-adsorvido com peptídeo bloqueador (inserto). Setas indicam imunomarcacção positiva para SVS2 na região apical do epitélio, e asteriscos a região luminal da glândula seminal. Lu: lúmen; Ep: epitélio; ML: músculo liso. Barra de escala: 20 e 100 µm. Os resultados são representativos de 2 (A e B) 3 (C) experimentos independentes.

Em relação ao perfil de expressão do transcrito *Svs3*, nossos resultados de RT-PCR confirmaram a sua presença na glândula seminal, mas também no testículo, cauda do epidídimo e ducto deferente (Figura 9A). Em adição, uma banda fraca correspondente ao transcrito *Svs3* foi observada na próstata ventral (Figura 9A). Não observamos a presença desse transcrito nas demais regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça e corpo) (Figura 9A).

Os resultados de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-SVS3 e extratos proteicos totais da glândula seminal, testículo e cauda do epidídimo revelaram a presença de múltiplas bandas conforme o órgão analisado (Figura 9B). A capacidade do anticorpo anti-SVS3 de detectar a SVS3 murina foi confirmada pela presença de uma única banda com aparente massa molecular de ~31 kDa correspondente à SVS3A murina recombinante (SVS3m), utilizada como controle positivo (Figura 9B). No fluido da glândula seminal observamos a presença de uma banda intensa com massa molecular aparente de ~35 kDa, correspondente à massa molecular esperada para a SVS3 (~30 kDa), além de uma segunda banda com massa molecular aparente de ~65 kDa, sendo esta uma provável forma dimérica da SVS3 secretada (Figura 9B). Curiosamente, na glândula seminal observamos a presença de banda dupla com massa molecular aparente mais elevada, ~40-43 kDa, que provavelmente corresponde à SVS3A e SVS3B inteiras (Figura 9B). Essa mesma banda dupla também foi detectada no testículo e cauda do epidídimo (Figura 9B). Além disso, uma terceira banda de massa molecular aparente de ~28 e ~29 kDa foi observada na cauda do epidídimo e glândula seminal, respectivamente (Figura 9B). Por fim, observamos a presença de uma banda intensa de massa molecular aparente de ~14 kDa na glândula seminal, testículo e cauda do epidídimo (Figura 9B). Nenhuma banda imunorreativa foi detectada quando as membranas foram incubadas com o anticorpo primário pré-adsorvido com o peptídeo bloqueador, utilizado como controle negativo (Figura 9B).

Os ensaios de imuno-histoquímica utilizando secções da glândula seminal de camundongos adultos revelaram imunomarcacão positiva para SVS3 na região apical e, de maneira menos abundante, na região basal das células epiteliais das curvaturas primária e secundária da mucosa, assim como no compartimento luminal (Figura 9C). Curiosamente,

imunomarcacão positiva para SVS3 também foi observada nas células do músculo liso (Figura 9C). A imunomarcacão positiva para SVS3 foi bloqueada após a incubaco das amostras com anticorpo primário pr-adsorvido com peptídeo bloqueador (Figura 9C; inserto).



**Figura 9.** Perfil de expressão de SVS3 em tecidos reprodutivos de camundongos adultos. **(A)** Imagem invertida de gel de agarose mostrando a deteco de RNAm de Svs3 por RT-PCR no testículo (T), epidídimo (segmento inicial, SI; cabeça, Cb; Corpo, Co; cauda, Cd), ducto deferente (DD), próstata ventral (P) e glândula seminal (GS). RNAm Ppia foi usado como controle endógeno. PM indica uma escada padrão de 100 pares de bases (pb). Controle negativo foi realizado na ausência de cDNA (Neg). **(B)** Deteco de SVS3 por análises de Western blot usando extrato de proteína total de cada tecido indicado. SVS3 murina recombinante foi usada como controle positivo. Principais bandas imunorreativas de SVS3 são indicadas (setas  direita). PM indica escala padrão de proteína (kDa). Controle negativo foi realizado com anticorpo primário pr-adsorvido com peptídeo bloqueador. **(C)** Localizao de SVS3 por imuno- histoquímica em tecidos da glândula seminal de camundongos adultos. Controle negativo foi realizado utilizando o anticorpo primário pr-adsorvido com peptídeo bloqueador (inserto). Setas indicam imunomarcacão positiva para SVS3 na região apical e basal do epitélio, asteriscos a região luminal, e pontas de seta células do músculo liso da glândula seminal. Lu: lúmen; Ep: epitélio; ML: músculo liso. Barra de escala: 20 e 100 µm. Os resultados são representativos de 2 (A e B) 3 (C) experimentos independentes.

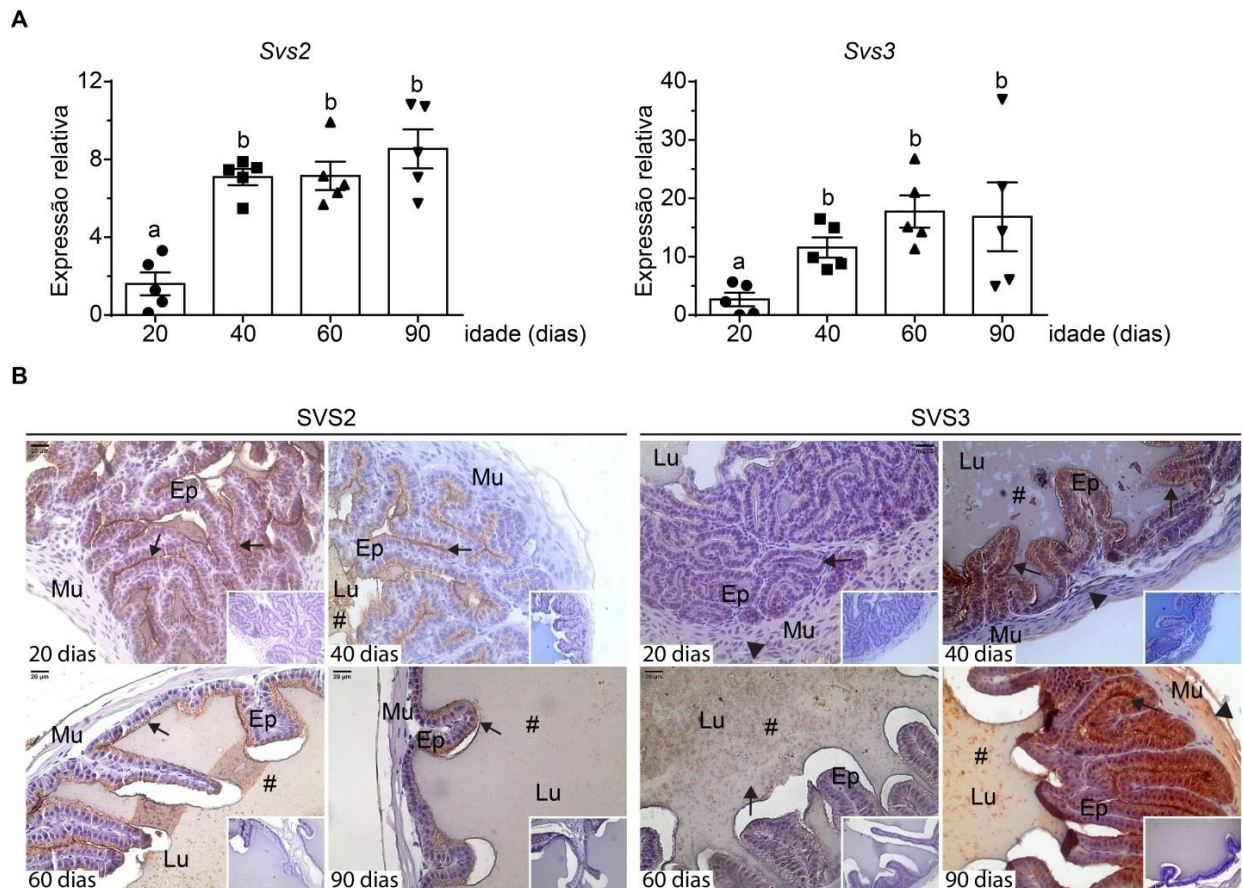
#### 4.2. A expressão dos genes Svs2 e Svs3  diferencialmente regulada por androgênios na glândula seminal

Com o intuito de investigar o papel dos androgênios sobre a regulao da expressão da SVS2 e SVS3 na glândula seminal de camundongos, empregamos dois modelos

experimentais: 1) maturação sexual e 2) orquiectomia bilateral com ou sem reposição com testosterona.

Os resultados de RT-qPCR demonstraram aumento aproximado de sete vezes na expressão relativa do transcrito *Svs2* na glândula seminal de camundongos de 40 dias de idade quando comparados com camundongos de 20 dias de idade (Figura 10A). A partir dos 40 dias de idade a expressão relativa do transcrito *Svs2* na glândula seminal se estabilizou, mantendo-se em níveis relativos semelhantes nos camundongos de 40, 60 e 90 dias (Figura 10A). Interessantemente, os experimentos de imuno-histoquímica revelaram imunomarcacão positiva para a SVS2 nas células epiteliais da glândula seminal de camundongos de 20 dias de idade, não havendo diferenças na sua abundância em relação aos animais mais velhos (Figura 10B). A expansão do compartimento luminal da glândula seminal de camundongos de 60 e 90 dias de idade resultou em maior abundância de imunomarcacão positiva para SVS2 neste compartimento em comparação com animais mais jovens (Figura 10B).

Em paralelo, observamos aumento aproximado de seis vezes na expressão relativa do transcrito *Svs3* na glândula seminal de camundongos de 40 dias de idade em comparação com os de 20 dias de idade (Figura 10A). Assim como observado para o transcrito *Svs2*, a expressão relativa do transcrito *Svs3* manteve-se em níveis semelhantes nos camundongos de 40, 60 e 90 dias (Figura 10A). A análise dos experimentos de imuno-histoquímica, por sua vez, demonstrou imunomarcacão positiva para SVS3 de baixa abundância nas células epiteliais e luz da glândula seminal de camundongos de 20 dias de idade, a qual se tornou mais intensa aos 40 dias (Figura 10B). A partir dessa idade, observamos estabilização da imunomarcacão positiva para a SVS3 na glândula seminal, exceto pelo aumento basal das células epiteliais aos 90 dias de idade (Figura 10B).

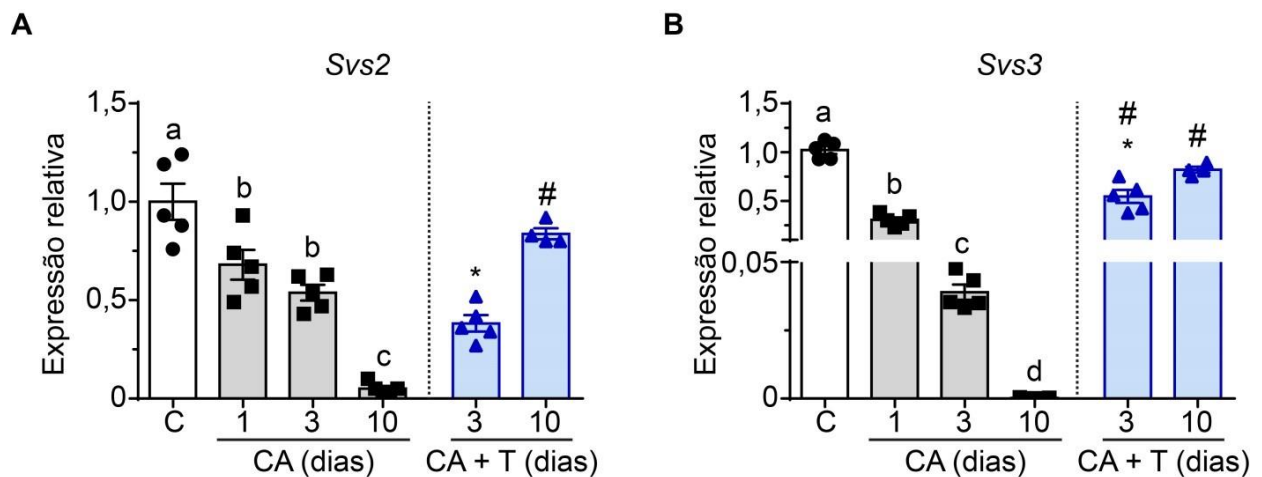


**Figura 10.** Efeito da maturação sexual na expressão e distribuição celular da SVS2 e SVS3 na glândula seminal de camundongos. **(A)** Expressão relativa dos transcritos *Svs2* e *Svs3* na glândula seminal de camundongos de diferentes estágios de maturação sexual (20, 40, 60 e 90 dias de idade). Valores foram normalizados utilizando média geométrica dos controles endógenos (*Rps18*, *Ppia* e *Hprt1*) e expressos em relação ao grupo de 20 dias de idade. Valores foram expressos como média ± EPM, n=5 animais/grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Tukey). **(B)** Localização imuno-histoquímica da SVS2 e SVS3 na glândula seminal de camundongos de 20, 40, 60 e 90 dias de idade. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Seta: imunomarcagem positiva em células epiteliais; cabeça de seta: imunomarcagem positiva em células da musculatura lisa; cerquilha: imunomarcagem positiva na luz da glândula seminal. Controle negativo foi realizado usando anticorpos primários pré-incubados com peptídeo bloqueador (insertos). Lu: lúmen; Ep: epitélio; ML: músculo liso. Barra de escala 20  $\mu$ m.

Os ensaios de RT-qPCR realizados com amostras de glândula seminal de animais adultos orquiectomizados com ou sem reposição com testosterona confirmaram a dependência androgênica dos genes *Svs2* e *Svs3*, porém com níveis diferentes de sensibilidade. Observamos queda de 1, 5 e 2 vezes nos níveis relativos do transcrito *Svs2* na glândula seminal após 1 e 3 dias de orquiectomia, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 11A). A progressão do tempo de orquiectomia acarretou em queda de 20 vezes nos níveis desse transcrito após 10 dias (Figura 11A). Curiosamente, a reposição diária com testosterona não foi capaz de prevenir a redução dos níveis relativos do transcrito *Svs2* após 3

dias de orquiectomia (Figura 11A). Por outro lado, a reposição diária com testosterona efetivamente reestabeleceu os níveis desse transcrito após 10 dias de orquiectomia (Figura 11A).

Em relação ao transcrito *Svs3*, observamos redução dos seus níveis relativos de 3, 25 e 43 vezes na glândula seminal dos animais orquiectomizados por 1, 3 e 10 dias, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 11B). Nesse caso, a reposição diária com testosterona restabeleceu parcialmente os níveis do transcrito *Svs3* após 3 dias de orquiectomia e totalmente, após 10 dias (Figura 11B).



**Figura 11.** Efeito da manipulação das concentrações plasmáticas de androgênios sobre a expressão dos transcritos *Svs2* e *Svs3* na glândula seminal de camundongos adultos. **(A)** Expressão relativa do transcrito *Svs2* na glândula seminal de camundongos orquiectomizados (CA) por 1, 3 e 10 dias com ou sem reposição diária de testosterona (8 mg/kg, s.c.; CA + T). **(B)** Expressão relativa do transcrito *Svs3* na glândula seminal de camundongos orquiectomizados (CA) 1, 3 e 10 dias com ou sem reposição diária de testosterona (10 mg/kg, s.c.; CA + T). Valores foram normalizados utilizando média geométrica dos controles endógenos (*Rps18*, *Ppia* e *Hprt1*) e expressos em relação ao grupo controle. Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais/grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Tukey comparando os grupos controle e orquiectomizados por 1, 3 e 10 dias). Asterisco e cerquilha indicam diferenças entre os grupos orquiectomizados, tratados com testosterona e eutanasiados após 3 ou 10 dias em relação aos grupos controle e orquiectomizados e eutanasiados após 3 ou 10 dias, respectivamente ( $p<0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Tukey, comparando os grupos controle, CA 3 dias e CA + T 3 dias ou os grupos controle CA 10 dias e CA + T 10 dias).

## Capítulo 2

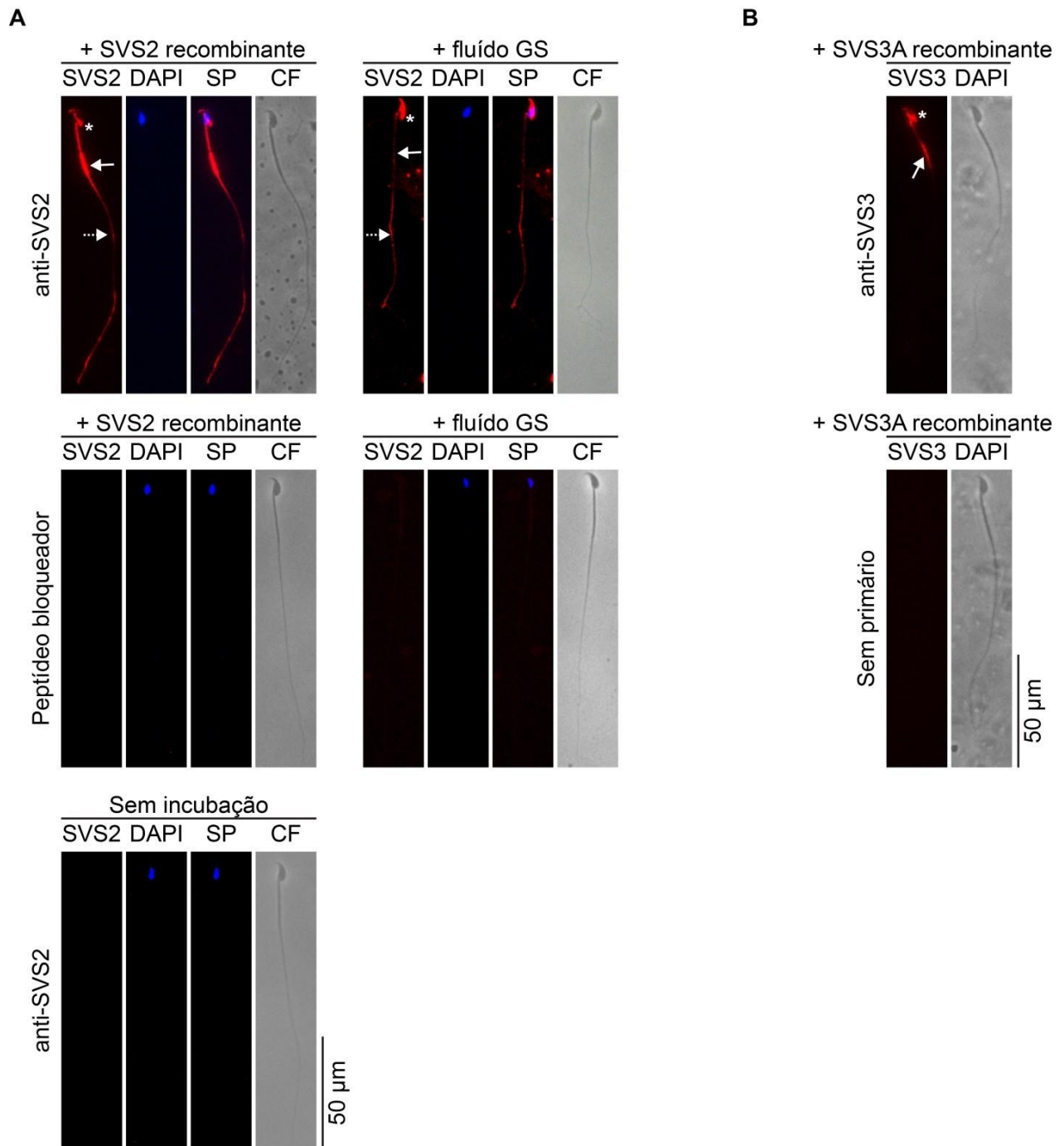
### ***Avaliação da motilidade espermática após incubação com diferentes concentrações da SVS2 e/ou SVS3A recombinantes.***

#### ***4.3. SVS2 nativa e recombinante e SVS3A recombinante interagem com espermatozoides maduros***

Visando investigar o padrão de interação da SVS2 com espermatozoides maduros, realizamos estudos de imunofluorescência utilizando espermatozoides isolados da cauda do epidídimo de camundongos adultos incubados com SVS2 murina recombinante (SVS2m; 5  $\mu$ M) ou com a fração solúvel em tampão PBS do fluido da glândula seminal, que contém a SVS2 nativa (Figura 8). Em ambas as condições experimentais, observamos a presença de imunomarcção positiva para SVS2 no flagelo e cabeça dos espermatozoides (Figura 12A). Espermatozoides incubados com SVS2m recombinante apresentaram imunomarcção positiva para SVS2 no flagelo (peça intermediária e peça principal) e cabeça (região acrossomal e pós-acrossomal) (Figura 12A). Observamos padrão similar de imunomarcção positiva para a SVS2 no flagelo dos espermatozoides incubados com o fluído da glândula seminal. Nesse caso, entretanto, a imunomarcção positiva para a SVS2 na cabeça apresentou maior intensidade, cobrindo as regiões acrossomal, segmento equatorial e pós-acrossomal (Figura 12A). Não observamos imunomarcção positiva para a SVS2 nos ensaios de controle negativo: 1) espermatozoides incubados com a SVS2m ou com o fluído da glândula seminal e submetidos ao ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-SVS2 pré-adsorvido com peptídeo bloqueador; e 2) sem incubações com SVS2m recombinante ou fluido da glândula seminal (Figura 12A).

Ensaio preliminares realizados com espermatozoides incubados com a SVS3A recombinante (SVS3m; 10  $\mu$ M) também demonstraram padrão de imunomarcção positiva para a SVS3 no flagelo e cabeça, porém com distribuição celular relativamente diferente em comparação com a SVS2 (Figura 12). Na cabeça do espermatozoide, observamos imunomarcção positiva para a SVS3 predominantemente na região pós-acrossomal; já no

flagelo a marcação foi restrita à peça intermediária (Figura 12B). Não observamos imunomarcação positiva para a SVS3 nos ensaios de controle negativo realizados com espermatozoides incubados com a SVS3m e submetidos ao ensaio de imunofluorescência na ausência de anticorpo anti-SVS3 (Figura 12B). Ensaios adicionais deverão ser realizados para confirmação do perfil de distribuição da SVS3m no espermatozoide.



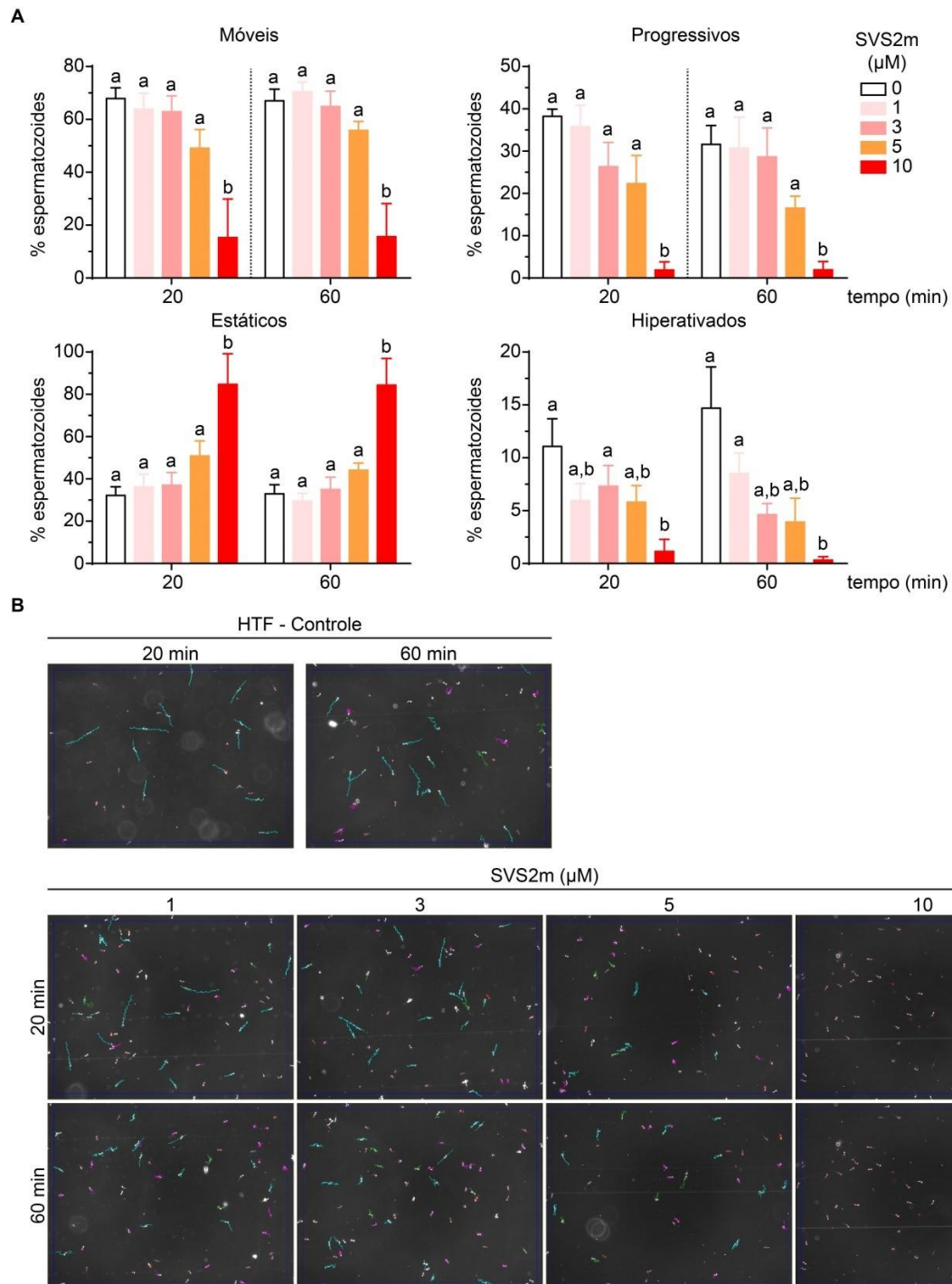
**Figura 12.** Distribuição celular de SVS2 e SVS3 em espermatozoides maduros de camundongos. **(A)** Imunolocalização indireta da SVS2 em espermatozoides coletados da cauda do epidídimo e incubados com o fluido da glândula seminal (SG) ou com SVS2 murina recombinante (5  $\mu$ m). Imunomarcção positiva para SVS2 foi detectada na cabeça (asterisco), peça intermediária (seta) e peça principal (seta pontilhada) do flagelo. Controle negativo foi realizado em espermatozoides incubados com SVS2 murina recombinante ou com o fluido da glândula seminal e submetidos ao ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-SVS2 pré-adsorvido com peptídeo bloqueador; e sem incubações com SVS2m recombinante ou fluido da glândula seminal. Resultados são representativos de três experimentos independentes. **(B)** Imunolocalização indireta da SVS3A em espermatozoides coletados da cauda do epidídimo e incubados com SVS3A murina recombinante (10  $\mu$ m). Imunomarcção positiva para SVS3A foi detectada na cabeça (asterisco) e peça intermediária (seta) do flagelo. Controle negativo foi realizado em espermatozoides incubados com SVS3A murina recombinante e submetidos ao ensaio de imunofluorescência na ausência de anticorpo anti-SVS3. Resultados são representativos de um experimento independente. Núcleos celulares foram corados com DAPI em azul. CF: Contraste de fase. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

#### 4.4. SVS2 murina recombinante inibe a motilidade de espermatozoides de camundongos *in vitro*

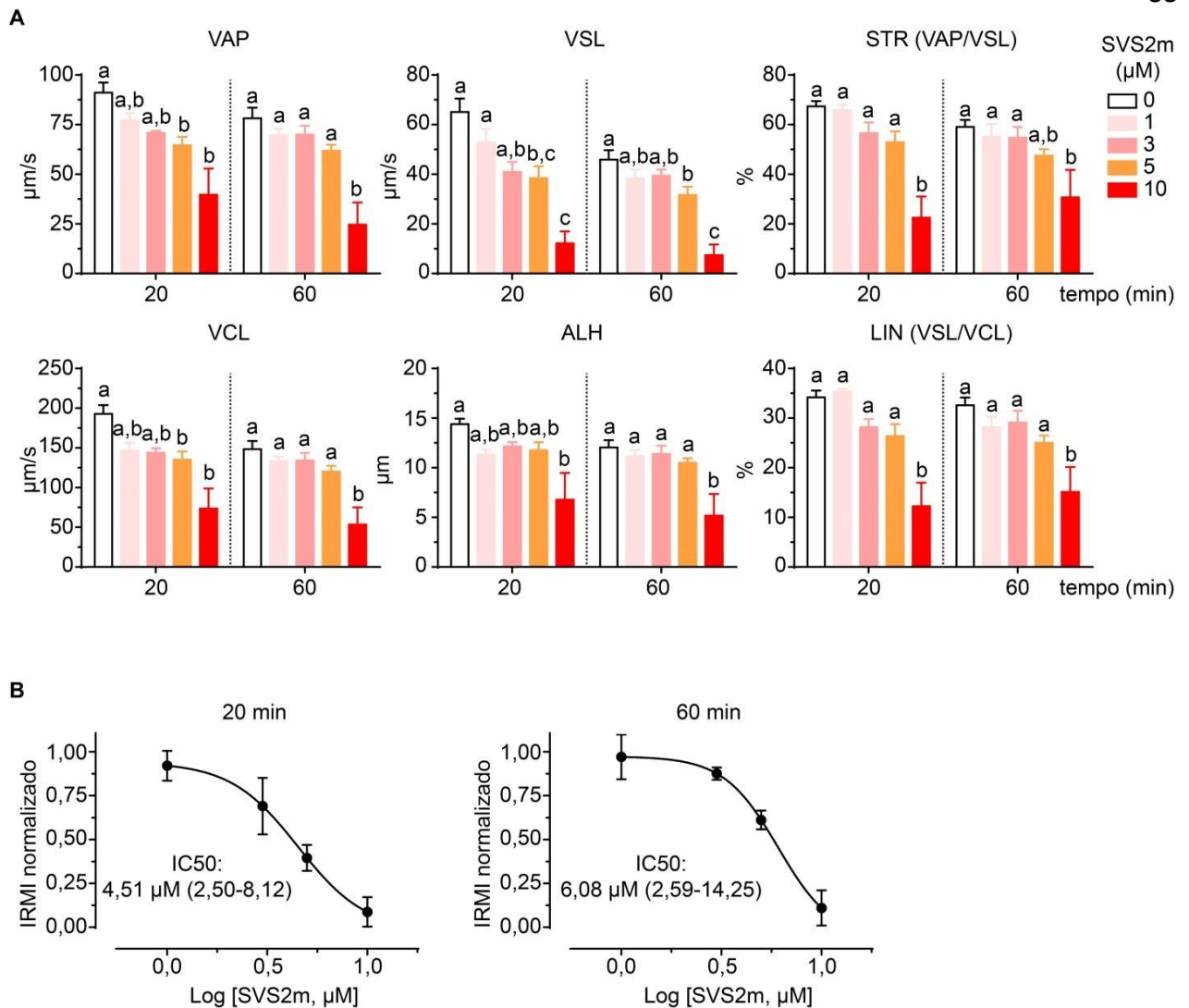
Com base na solubilidade da SVS2 murina recombinante (SVS2m), avaliamos seu efeito sobre a motilidade de espermatozoides isolados da cauda do epidídimo nas concentrações 1, 3 e 10  $\mu\text{M}$  após 20 e 60 min. Nossos resultados demonstram que a SVS2m inibiu a motilidade espermática *in vitro* de forma dependente da concentração. Nas concentrações de 1, 3 e 5  $\mu\text{M}$ , a SVS2m não alterou a motilidade espermática (total, progressiva e hiperativada) em comparação com o grupo controle nos tempos analisados (Figura 13). No entanto, 10  $\mu\text{M}$  de SVS2m reduziu a motilidade total, progressiva e hiperativada após 20 e 60 min de incubação (Figura 13).

Em relação aos parâmetros de cinemática, não observamos efeitos para a SVS2m nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$  (Figura 14). Já na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , a SVS2m reduziu os valores de VAP, VSL e VCL 20 min após a incubação, os quais retornaram a níveis semelhantes aos do grupo controle após 60 min (Figura 14). Efeitos mais drásticos foram observados na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , na qual a SVS2m afetou negativamente todos os parâmetros de cinemática que descrevem a progressividade (VAP, VSL e STR) e a vigorosidade (VCL, ALH e LIN) do movimento espermático (Figura 14).

Os efeitos negativos da SVS2m na motilidade cinemática espermática foram refletidos na redução de forma dependente da concentração do Índice de Inibição da Motilidade Relativa (iRMI) normalizado ( $\text{VSL} \times \% \text{ motilidade do grupo experimental} / \text{VSL} \times \% \text{ da motilidade do grupo controle}$ ). O iRMI permite a normalização de cada experimento para seu respectivo controle, reduzindo as variações entre ensaios e a construção de uma curva concentração- efeito. Com base na curva concentração-efeito do iRMI normalizado, observamos que a SVS2m reduziu a motilidade espermática com valores de  $\text{IC}_{50}$  (intervalo de confiança de 95%) de 4,51  $\mu\text{M}$  (2,50-8,12) e 6,08  $\mu\text{M}$  (2,59-14,25  $\mu\text{M}$ ) 20 e 60 min após a incubação, respectivamente (Figura 16).



**Figura 13.** Efeito da SVS2m sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos. **(A)** Percentual de espermatozoides móveis, progressivos, estáticos e hiperativados após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  SVS2m por 20 e 60 min. O grupo controle foi realizado na ausência de SVS2m (0). Espermatozoides foram classificados como móveis, progressivos, hiperativados e estáticos com base nos parâmetros de cinemática (ver material e método). Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=4-13$  experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey). Dados foram convertidos em raiz quadrada do arcosseno antes da análise estatística. **(B)** Imagens representativas obtidas demonstrando trajetórias dos espermatozoides incubados nas condições experimentais apresentadas em (A). Espermatozoide móvel (traçado verde ou rosa); Espermatozoide progressivo (traçado azul); Espermatozoide estático (ponto vermelho).



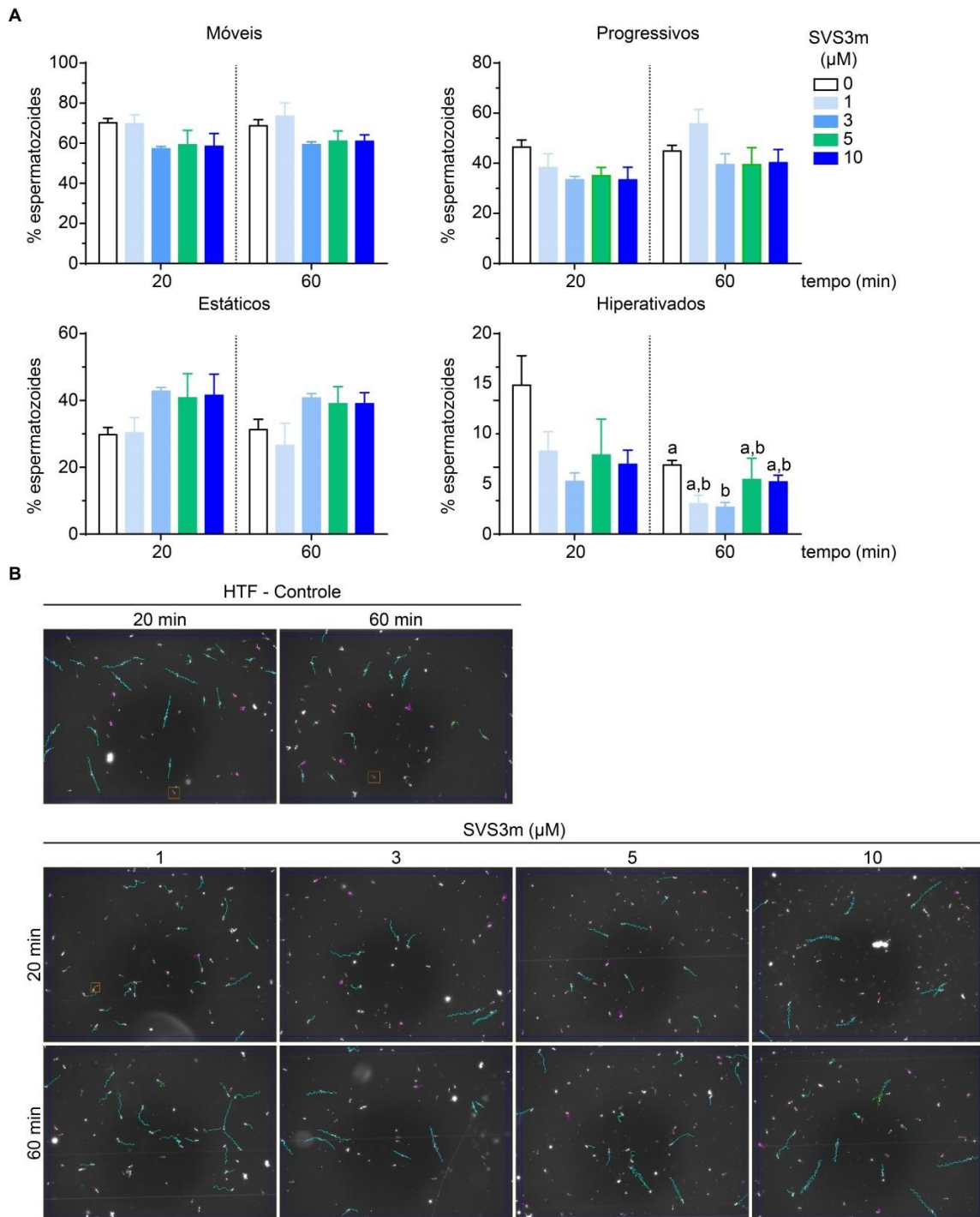
**Figura 14.** Efeito da SVS2m sobre parâmetros de cinemática de espermatozoides de camundongos. **(A)** Parâmetros de cinemática que descrevem movimentos espermáticos progressivos (VAP, VSL e STR) e vigorosos (VCL, ALH e LIN) após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10 µM SVS2m por 20 e 60 min. Valores foram expressos como média ± EPM, n=4-13 experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey). Dados percentuais (STR e LIN) foram convertidos em raiz quadrada do arcosseno antes da análise estatística. **(B)** Curva concentração-efeito do iRMI normalizado após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10 µM SVS2m por 20 e 60 min. A IC50 para cada curva foi calculada a partir da regressão não-linear dos dados. Valores foram expressos como média ± EPM, n=4-13 experimentos independentes.

#### 4.5. SVS3A murina recombinante reduz parâmetros de vigorosidade, mas não afeta a motilidade de espermatozoides de camundongos

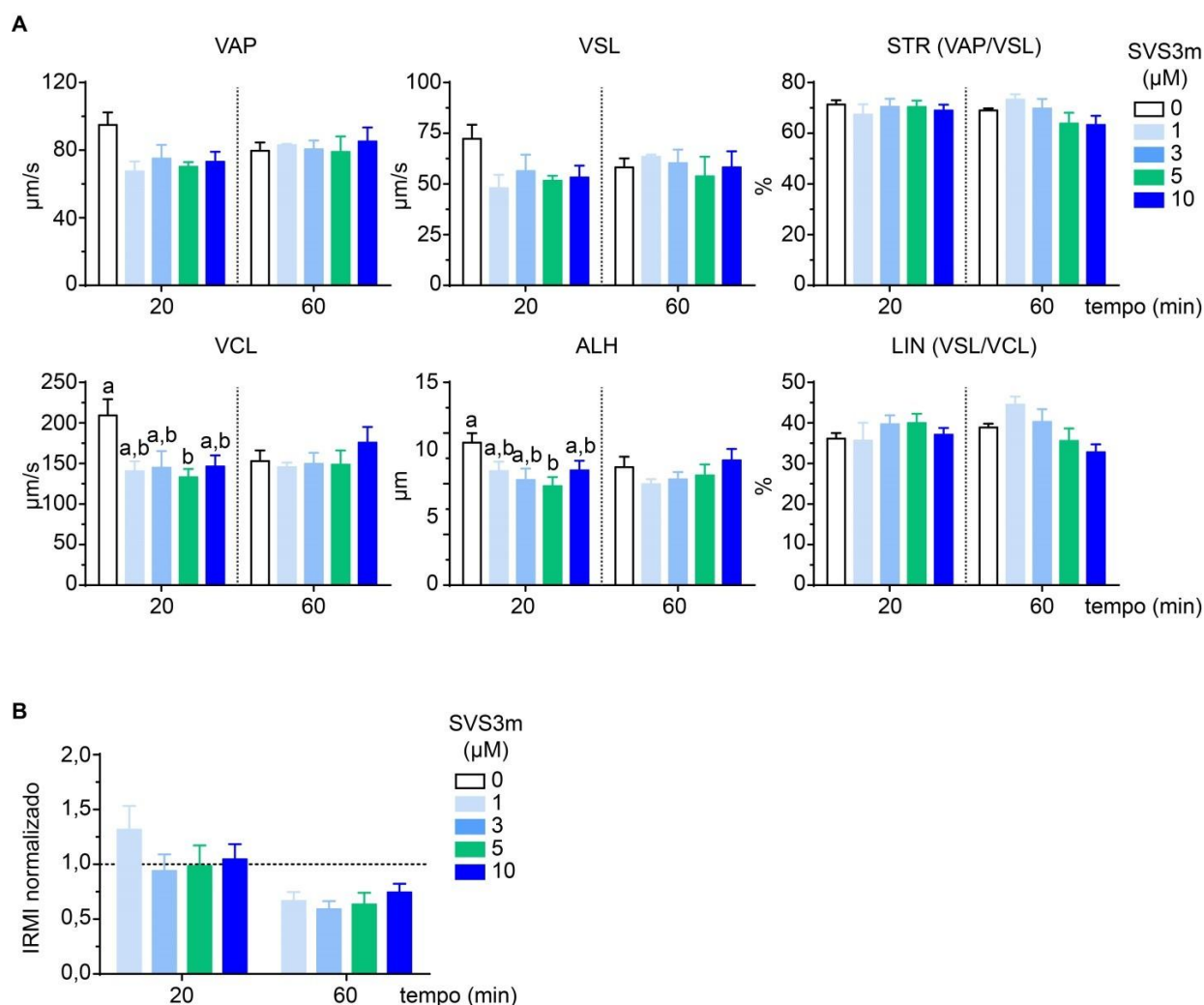
Utilizando concentrações semelhantes às da SVS2m (1, 3, 5 e 10 µM), observamos que a SVS3A murina recombinante (SVS3m) não alterou a motilidade total e progressiva em relação ao grupo controle após 20 e 60 min (Figura 15). A motilidade hiperativada também não foi alterada, exceto por uma redução nas amostras incubadas com 3 µM SVS3m após 60 min (Figura 16). Em relação aos parâmetros de cinemática, observamos que a SVS3m afetou

negativamente os parâmetros que descrevem a vigorosidade espermática (VCL e ALH) na concentração de 5  $\mu$ M após 20 min de incubação, mas não aos 60 min (Figura 16A).

De forma consistente com o observado em seus efeitos sobre a motilidade e cinemática espermáticas, a SVS3m não alterou os valores de iRMI normalizado de forma dependente da concentração não sendo possível construir uma curva dose-resposta (Figura 16B). Além disso, não observamos diferenças nos valores de iRMI normalizado entre as concentrações da SVS3m em ambos os tempos analisados (Figura 16B).



**Figura 15.** Efeito da SVS3m sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos. **(A)** Percentual de espermatozoides móveis, progressivos, estáticos e hiperativados após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  SVS3m por 20 e 60 min. O grupo controle foi realizado na ausência de SVS3m (0). Espermatozoides foram classificados como móveis, progressivos, hiperativados e estáticos com base nos parâmetros de cinemática (ver material e método). Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=4-7$  experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $P<0,05$ ; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey). Dados foram convertidos em raiz quadrada do arcosseno antes da análise estatística. **(B)** Imagens representativas obtidas demonstrando trajetórias dos espermatozoides incubados nas condições experimentais apresentadas em (A). Espermatozoide móvel (traçado verde ou rosa); Espermatozoide progressivo (traçado azul); Espermatozoide estático (ponto vermelho).



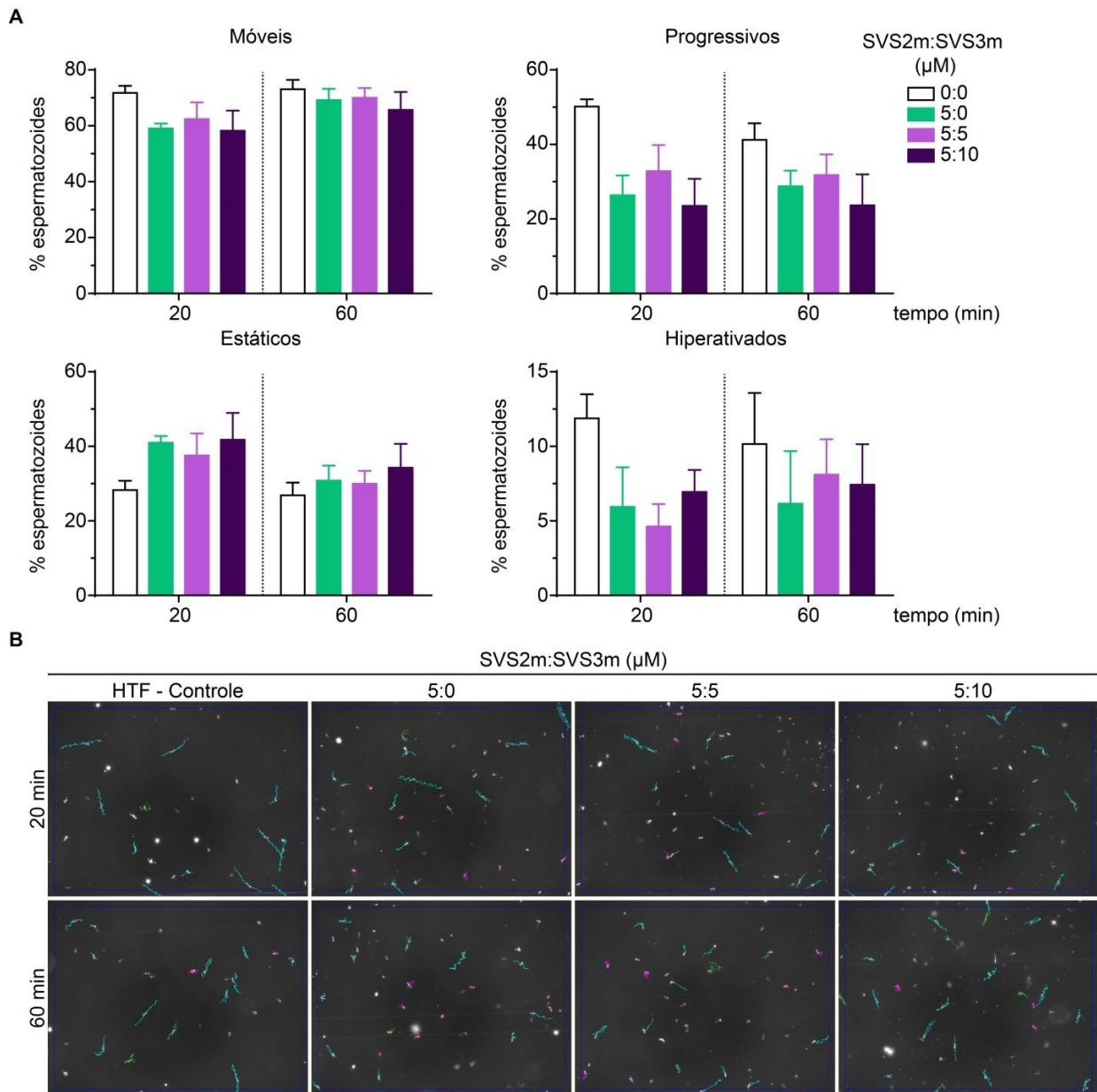
**Figura 16.** Efeito da SVS3m sobre parâmetros de cinemática de espermatozoides de camundongos. **(A)** Parâmetros de cinemática que descrevem movimentos espermáticos progressivos (VAP, VSL e STR) e vigorosos (VCL, ALH e LIN) após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de SVS3m por 20 e 60 min. Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=4-7$  experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey). Dados percentuais (STR e LIN) foram convertidos em raiz quadrada do arcosseno antes da análise estatística. **(B)** Valores do iRMI normalizado após incubação com diferentes concentrações 1, 3, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de SVS3m por 20 e 60 min. Valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=4-7$  experimentos independentes. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ( $P<0,05$ ; ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey).

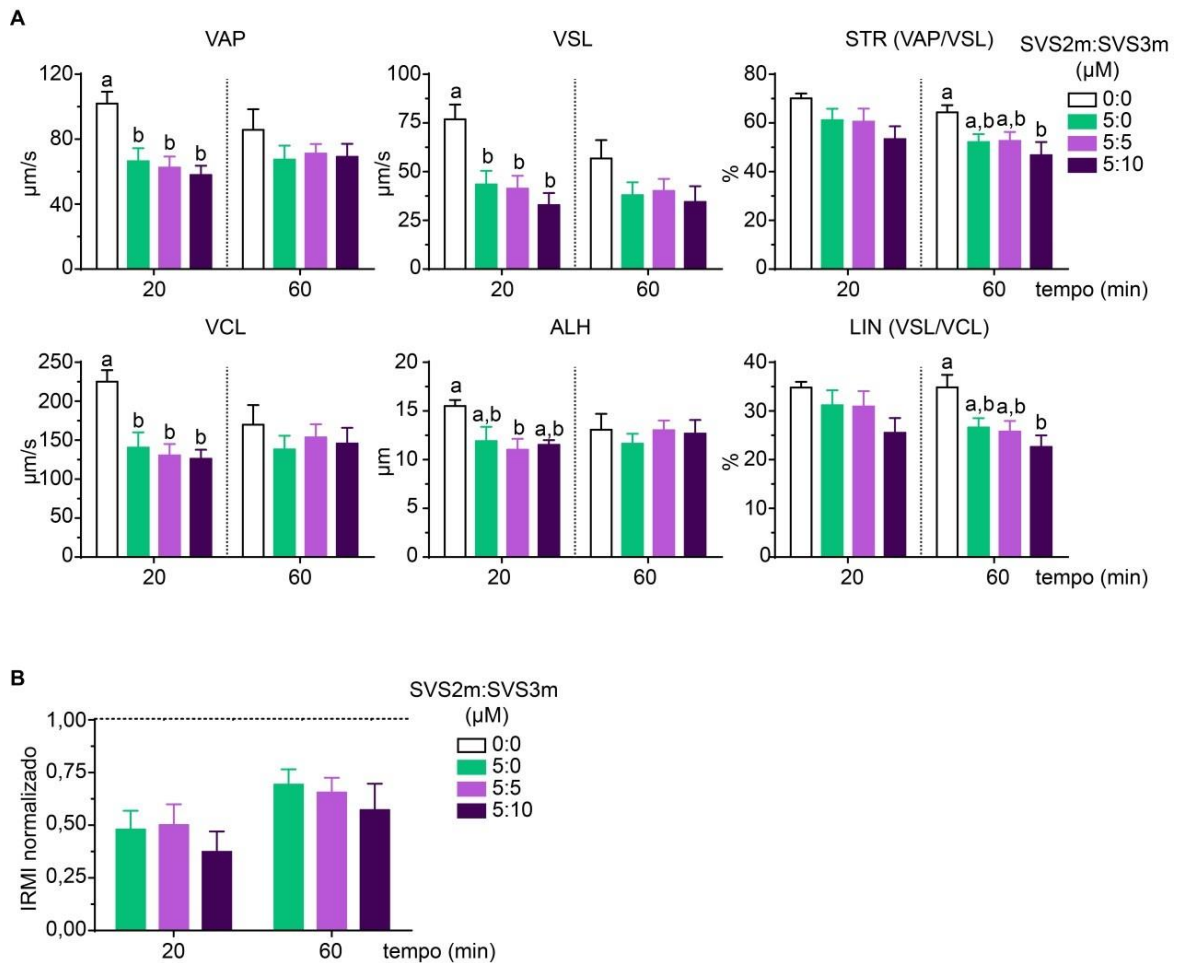
#### 4.6. A SVS3A recombinante não possui efeito sinérgico sobre os efeitos inibitórios da SVS2 recombinante sobre a motilidade espermatozoides de camundongos

Com o intuito de testar a hipótese de que a SVS3 facilita os efeitos inibitórios da SVS2 sobre a motilidade espermática, avaliamos parâmetros de motilidade e cinemática em espermatozoides incubados com ambas as proteínas recombinantes. Para isso, decidimos utilizar a SVS2m na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (Figura 17), variando as concentrações de SVS3m para manter relações molares com a SVS2 de 1:1 (SVS2 5  $\mu\text{M}$  e SVS3 5  $\mu\text{M}$ ) e 1:2 (SVS2 5

$\mu\text{M}$  e SVS3 10  $\mu\text{M}$ ). Observamos que a co-incubação da SVS2m com a SVS3m não alterou a motilidade total e progressiva em relação ao grupo controle e incubado apenas com a SVS2m (Figura 17). De forma semelhante, o percentual de espermatozoides hiperativados também permaneceu inalterado (Figura 17).

Além disso, observamos que os parâmetros de cinemática espermática VAP, VSL e VCL, os quais foram afetados na presença de 5  $\mu\text{M}$  SVS2m em relação ao grupo controle, não foram modificados pela co-incubação com a SVS3m nos tempos analisados (Figura 18A). Vale destacar, entretanto, que a co-incubação SVS2m e SVS3m (razão molar 1:2) produziu redução dos parâmetros STR e LIN em relação ao grupo controle, mas não ao grupo tratado apenas com a SVS2m (Figura 18A). De forma consistente com esses resultados, os valores de iRMI normalizado induzidos pela presença de 5  $\mu\text{M}$  SVS2m não foram modificados pela co- incubação com a SVS3m (Figura 18B).





**Figura 18.** Efeito da co-incubação SVS2m e SVS3m sobre parâmetros de cinemática de espermatozoides de camundongos. **(A)** Parâmetros de cinemática que descrevem movimentos espermáticos progressivos (VAP, VSL e STR) e vigorosos (VCL, ALH e LIN) após incubação com SVS2m na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , variando as concentrações de SVS3m para manter relações molares com a SVS2 de 1:1 (SVS2 5  $\mu\text{M}$  e SVS3 5  $\mu\text{M}$ ) e 1:2 (SVS2 5  $\mu\text{M}$  e SVS3 10  $\mu\text{M}$ ) por 20 e 60 min. 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). Dados percentuais (STR e LIN) foram convertidos em raiz quadrada do arcosseno antes da análise estatística. **(B)** Valores do iRMI normalizado com SVS2m na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , variando as concentrações de SVS3m para manter relações molares com a SVS2 de 1:1 (SVS2 5  $\mu\text{M}$  e SVS3 5  $\mu\text{M}$ ) e 1:2 (SVS2 5  $\mu\text{M}$  e SVS3 10  $\mu\text{M}$ ) por 20 e 60 min. 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).

## ***5. Discussão***

## 5. Discussão

A habilidade de adquirir motilidade após a ejaculação é uma característica essencial para a função dos espermatozoides e consequentemente para a fertilidade masculina (Suárez & Osman, 1987). Esse evento deve ser finamente regulado para que o gameta masculino preserve energia e adquira sua capacidade máxima de fertilização no momento adequado (Silva *et al.*, 2013). Em mamíferos, as proteínas da família REST, secretadas pela glândula seminal, são os principais elementos do plasma seminal, sendo responsáveis por esse controle fino e temporal da aquisição de motilidade espermática pelo espermatozoide ejaculado (Robert & Gagnon, 1999; O'Rand *et al.*, 2011). As proteínas REST's humanas, SEMG1 e SEMG2, são fundamentais para a formação do coágulo de sêmen após a ejaculação e para a manutenção dos espermatozoides presos, em estado imóvel, no interior do coágulo (Ulvback *et al.*, 1992; Robert & Gagnon, 1999). De fato, a SEMG1 atua como um fator endógeno inibitório da motilidade espermática, capacitação e reação acrossômica (Robert & Gagnon, 1995; de Lamirande *et al.*, 2001; de Lamirande & Lamothe, 2010; Mitra *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Neste trabalho, demonstramos que a SVS2 murina, ortóloga da SEMG1 humana (Kawano & Yoshida, 2007), interage com os espermatozoides maduros e inibe a motilidade progressiva e hiperativada. Nossos resultados fornecem novas perspectivas quanto ao papel das proteínas REST como moduladores fisiológicos da motilidade espermática, sua funcional conservação entre roedores e primatas, bem como sobre sua potencial exploração como estratégias para contracepção masculina.

Apesar de inicialmente considerados genes de expressão específica na glândula seminal, estudos mostraram que tanto o *SEMG1* quanto o *SEMG2* humanos também podem ser encontrados em outros órgãos reprodutivos (como glândula seminal, ducto deferente e epidídimo) e não-reprodutivos (como traquéia, rins e músculo esquelético) em condições fisiológicas (Lundwall *et al.*, 2002). De fato, a expressão dos genes *SEMG1* e *SEMG2* (transcrito e/ou proteína) foi observada na próstata, corpo e cauda do epidídimo, ducto deferente e traqueia (Lundwall *et al.*, 2002). Visto que os genes *Svs2* e *Svs3* murinos são ortólogos aos *SEMG1* e *SEMG2* humanos (Clauss *et al.*, 2005) e devido à ausência de informação sobre seus perfis de

expressão em camundongos na literatura, consideramos atraente investigar suas presenças no sistema reprodutor masculino.

Nossos resultados de RT-PCR confirmaram a expressão abundante do transcrito *Svs2* na glândula seminal de camundongos, como previamente descrito (Harris *et al.*, 1990; Kawano & Yoshida, 2007; Araki *et al.*, 2015; Araki *et al.*, 2016). Além disso, esse transcrito apresentou perfil de expressão semelhante ao do seu ortólogo humano *SEMG1*, sendo encontrado no ducto deferente, cauda do epidídimo e, em menor abundância, na próstata ventral. Vale ressaltar que a presença do transcrito *Svs2* na cauda do epidídimo, mas não em outras regiões epididimárias, sugere a existência de mecanismos regulatórios específicos de cada região para a regulação de genes da família REST. Esse achado é consistente com a expressão regionalizada de diversos genes ao longo do epidídimo, os quais podem apresentar funções específicas em eventos associados à maturação espermática e ainda ao seu armazenamento em estado quiescente (Belleannée *et al.*, 2012).

Apesar de apresentar um perfil transcricional mais amplo no trato reprodutor masculino, os ensaios de *Western blot* indicaram que a tradução do RNAm *Svs2* em uma proteína com sua sequência primária predita é mais restrita. De fato, nossos resultados de *Western blot* revelaram a presença de uma única banda imunorreativa correspondente à massa molecular esperada para a SVS2 em extratos proteicos da glândula seminal e do seu fluido (~45 kDa), corroborando dados da literatura (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2014). A imunomarcagem positiva abundante para a SVS2 nos compartimentos epitelial e luminal da glândula seminal de camundongos confirma sua produção pelas células epiteliais e secreção para o fluido glandular. Por outro lado, a análise de extratos proteicos totais da cauda do epidídimo não permitiu a detecção da banda de ~45 kDa, mas de outra com massa molecular aparente cerca de 3 vezes menor (~11 kDa). Estes resultados sugerem três possíveis cenários em relação à natureza desta banda de ~11 kDa: 1) representa um produto de degradação proteolítica da SVS2; 2) representa uma isoforma específica da cauda do epidídimo como um resultado de um *splicing* alternativo do RNAm ou uma modificação pós-traducional da proteína; ou 3) é resultado de interação não-específica do anticorpo anti-SVS2 com um antígeno

presente na cauda do epidídimo. A ausência dessa banda de ~11 kDa nos ensaios de controle negativo, realizados com anticorpo anti-SVS2 pré-adsorvido com o peptídeo bloqueador, reduz a possibilidade de que ela seja produto de reação inespecífica do anticorpo. Vale salientar que análises de *Western blot* realizadas por Kawano *et al.* (2014) também falharam em detectar a SVS2 inteira no epidídimo de camundongos, embora os autores não tenham especificado a região do epidídimo utilizada nestes ensaios. Isso é consistente com o fato de não termos observamos imunomarcção positiva para a SVS2 em espermatozoides isolados da cauda do epidídimo que não foram incubados com o fluído da glândula seminal ou SVS2 murina recombinante. Portanto, nossos dados, em conjunto com a literatura, sugerem que o epidídimo não é uma fonte adicional de SVS2 no sistema reprodutor de camundongos.

Em relação ao transcrito *Svs3*, observamos que seu perfil de expressão é mais amplo, sendo encontrado na glândula seminal e cauda do epidídimo, mas também no testículo, ducto deferente e, em menor abundância, na próstata ventral. Apesar de pouco abundantes, a expressão dos transcritos *Svs2* e *Svs3* na próstata está de acordo com estudos prévios, sugerindo que este órgão pode ser uma fonte de diferentes proteínas REST's em roedores (Lin *et al.*, 2002; Abbott *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2010). É importante salientar que, apesar de desenhados para amplificação do transcrito *Svs3a*, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em nossos estudos de PCR convencional e em tempo real amplificam regiões comuns entre os transcritos *Svs3a* (variantes 1 e 2) e *Svs3b* (Anexo III). Por este motivo, não podemos determinar a expressão diferencial dos transcritos desses genes nos órgãos positivos, sendo necessária a realização de estudos adicionais utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *Svs3a* e *Svs3b*.

De forma semelhante, o anticorpo anti-SVS3 utilizado neste estudo detecta sequência de aminoácidos comum à SVS3A e SVS3B, as quais apresentam o mesmo número de resíduos de aminoácidos em suas sequências inteiras (Anexo II). Em concordância com a literatura, nossos resultados de *Western blot* revelaram a presença de uma banda imunorreativa para o anticorpo anti-SVS3 no tamanho correspondente à massa molecular esperada para a SVS3 secretada (sem o peptídeo sinal; ~35 kDa) em extratos proteicos do fluído da glândula seminal

(Lundwall *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2002; Araki *et al.*, 2016). É provável que a segunda banda encontrada nessa amostra, em torno de 65 kDa, corresponda à forma dimérica da SVS3 presente no fluído da glândula seminal.

Por outro lado, a análise dos resultados obtidos a partir dos extratos proteicos totais do testículo, cauda do epidídimo e glândula seminal (sem o conteúdo luminal) revelou um cenário mais complexo, devido à presença de múltiplas bandas imunorreativas para o anticorpo anti-SVS3. Com base na análise de suas massas moleculares aparentes, propomos que a banda dupla em torno de ~40-43 kDa, encontrada em todos os órgãos analisados corresponde à SVS3A (variantes 1 e 2) e SVS3B inteiras (com o peptídeo sinal). Já as bandas de massas moleculares menores (~29 e ~14 kDa) podem ser resultado de: 1) degradação proteolítica; 2) modificações pós-traducionais; ou 3) interação não-específica do anticorpo anti-SVS3 com outras proteínas. Assim como observado para a SVS2, ensaios de controle negativo realizados com anticorpo anti-SVS3 pré-adsorvido com o peptídeo bloqueador dão lastro à hipótese de que todas as bandas encontradas são específicas. Ressaltamos, entretanto, que a confirmação da identidade dessas bandas requer experimentos adicionais.

Em conjunto, nossos resultados indicam que a expressão dos genes da família REST no sistema reprodutor de machos é conservada entre roedores e primatas. Vale salientar que a função da SVS2 e SVS3 nestes novos locais de expressão ainda precisa ser investigada. Sabe-se que sequências na região N-terminal da SEMG1 possuem atividade antimicrobiana e imunomoduladora (Robert & Gagnon, 1999; Bourgeon *et al.*, 2004). Considerando que a região N-terminal é relativamente conservada entre a SEMG1/SEMG2 e SVS2/SVS3, uma hipótese plausível é que a SVS2 e SVS3 sejam componentes do sistema imunológico inato do sistema reprodutor masculino de camundongos.

A manutenção da estrutura, expressão gênica e função da glândula seminal é altamente dependente de androgênios, cujas concentrações plasmáticas atingem valores máximos em indivíduos sexualmente maduros (Nishino *et al.*, 2004; Justulin *et al.*, 2006; Simanainen *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2010). Para investigar o impacto da maturação sexual sobre a expressão da SVS2 e SVS3 (transcrito e proteína), realizamos ensaios de RT-qPCR e imuno-histoquímica

com amostras de glândula seminal de camundongos sexualmente imaturos (20 dias), (pré) púberes (40 e 60 dias) e sexualmente maduros (90 dias). A expressão relativa dos transcritos *Svs2* e *Svs3* na glândula seminal revelou correlação positiva com a maturação sexual, atingindo platôs entre 40-90 e 60-90 dias de idade, respectivamente. Esses resultados denotam a alta dependência de ambos os genes a androgênios, visto que em camundongos as concentrações plasmáticas de testosterona aumentam rapidamente entre 15 e 40 dias de idade, atingindo um platô por volta dos 100 dias de vida (Wang *et al.*, 2015). Consistentemente, observamos presença da SVS2 e SVS3 nas células epiteliais da glândula seminal de animais de 20 dias de idade, indicando que sua expressão correlaciona-se com o início do aumento da esteroidogênese testicular (Wang *et al.*, 2015). No entanto, observamos que a imunomarcagem positiva para a SVS3 aumentou gradativamente na glândula seminal de animais de 20 a 60 dias de idade, enquanto a abundância da imunomarcagem positiva para a SVS2 foi semelhante em todas as idades analisadas. Esses resultados indicaram que a sensibilidade do gene *Svs3* é maior do que a do *Svs2* aos androgênios. Para testar essa hipótese, exploramos o modelo experimental da orquiectomia bilateral em animais adultos.

A redução das concentrações plasmáticas de androgênios provocada pela orquiectomia bilateral reduziu progressivamente os níveis relativos dos transcritos *Svs2* e *Svs3*, os quais atingiram níveis mínimos 10 dias após a remoção cirúrgica dos testículos. Em suporte à nossa hipótese, os níveis relativos do transcrito *Svs3* foram reduzidos mais rapidamente e em maior intensidade na glândula seminal dos animais orquiectomizados em comparação com os do transcrito *Svs2*. Consistentemente, a reposição com testosterona restabeleceu mais rapidamente os níveis relativos do transcrito *Svs3*. Dessa forma, nossos resultados confirmaram a dependência de ambos os genes *Svs2* e *Svs3* a androgênios, e ainda mostraram a maior sensibilidade do *Svs3* a alterações nos níveis circulantes desses hormônios.

Em camundongos, a SVS2 desempenha papéis importantes na formação do plugue copulatório, assim como na regulação das funções espermáticas e sobrevivência dos espermatozoides no sistema reprodutor da fêmea (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*,

2014; Araki *et al.*, 2015; Araki *et al.*, 2016). Fisiologicamente, a SVS2 interage com o espermatozoide após a ejaculação, atuando como um fator inibidor da capacitação e da reação acrossômica, preservando a viabilidade do espermatozoide durante sua jornada até o oviduto, onde o gameta masculino cumpre sua função primordial de fertilizar o oócito (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2014). Acredita-se que durante a passagem dos espermatozoides pelo oviducto, a SVS2 é degradada por uma enzima semelhante à PSA e se desprende da superfície espermática, permitindo que os espermatozoides iniciem a capacitação e a reação acrossômica nas porções mais profundas do sistema reprodutor feminino (Kawano & Yoshida, 2007; Kawano *et al.*, 2014). De fato, camundongos com deleção do gene *Svs2* tiveram a fertilidade reduzida tanto em comparação com animais do tipo selvagem, devido à ausência da formação do plugue copulatório e pela morte prematura dos espermatozoides no útero (Kawano *et al.*, 2014; Shindo *et al.*, 2019).

Em harmonia com essas observações, nossos resultados confirmaram a capacidade da SVS2, recombinante e nativa, de interagir com espermatozoide maduro. Observamos imunomarcagem específica para a SVS2 na cabeça (regiões acrossomal e pós-acrossomal) e flagelo (peças intermediária e principal) de espermatozoides isolados da cauda do epidídimo, o que é consistente com funções na regulação da reação acrossômica e motilidade espermática, respectivamente. Um padrão semelhante de imunomarcagem também foi observado em espermatozoides humanos ejaculados analisados com anticorpo anti-SEMG1 (Wang *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009). Em desacordo com os nossos resultados, Kawano & Yoshida (2007) descreveram que o anticorpo anti-SVS2 interagiu de forma inespecífica com o flagelo do espermatozoide isolado da cauda do epidídimo de camundongos. Diferenças nos procedimentos experimentais podem ter sido a causa destes resultados discrepantes. De fato, empregamos concentrações 50 vezes mais baixas do anticorpo anti-SVS2 do que aquelas utilizadas por esses autores. Além disso, os resultados obtidos em nossos ensaios de controle negativo (ausência de incubação com proteína recombinante e pré-incubação do anticorpo primário com peptídeo bloqueador) reforçam a especificidade do perfil de interação entre a SVS2 e o espermatozoide murino.

Outro ponto em favor dos nossos resultados foi que a distribuição da SVS2 no flagelo do espermatozoide murino foi consistente com os efeitos inibitórios da SVS2m recombinante sobre a motilidade espermática. Demonstramos que SVS2m reduziu o percentual de espermatozoides móveis e progressivos de forma dependente da concentração e tempo de incubação. Os efeitos inibitórios da SVS2m sobre a motilidade progressiva também foram acompanhados pela redução dos parâmetros de cinemática que descrevem os movimentos progressivos, como VSL, VAP e STR. A motilidade progressiva é caracterizada por alta velocidade linear e está associada a batimentos flagelares simétricos e de baixa amplitude (Mortimer, 2000). Este padrão de motilidade é essencial para que os espermatozoides se movam em meios de baixa viscosidade, como o sêmen liquefeito (Goodson *et al.*, 2011). Sabe-se que fatores que interferem na habilidade dos espermatozoides de iniciarem a motilidade progressiva podem ser causas de infertilidade masculina (Freitas *et al.*, 2017).

Os efeitos inibitórios da SVS2m recombinante foram consistentemente refletidos na redução dos valores do parâmetro iRMI normalizado, que correlaciona a motilidade e o VSL, parâmetros que apresentaram correlação positiva com a taxa de fertilização *in vitro* (Hirano *et al.*, 2001). De fato, observamos redução do iRMI de forma dependente da concentração da SVS2m, valores de IC<sub>50</sub> de 4,51  $\mu$ M e 6,08  $\mu$ M após 20 e 60 minutos de incubação, respectivamente. Esses valores são aproximadamente 5 vezes menores do que a concentração fisiológica estimada para a SVS2 no sêmen murino (Kawano & Yoshida, 2007). Dessa forma, é provável que o espermatozoide ejaculado seja banhado pelo plasma seminal contendo concentração de SVS2 suficiente para inibir sua motilidade.

A capacitação espermática é um processo essencial para a fertilidade, pois permite que os espermatozoides sofram reação acrossômica e fertilizem o oócito. Um dos eventos observados durante a capacitação é a mudança do padrão de motilidade espermática de progressivo para hiperativado (Suárez & Osman, 1987; Suarez & Ho, 2003). Espermatozoides removidos do oviduto ou incubados sob condições capacitantes apresentam o padrão de motilidade hiperativada, caracterizada por movimentos assimétricos e menos progressivos associados a curvas flagelares de alta amplitude (Goodson *et al.*, 2011). O movimento hiperativado é

fundamental para a penetração dos espermatozoides na zona pelúcida e, portanto, é uma característica espermática essencial para a fertilização (Mortimer, 2000; Suarez & Ho, 2003; Turner, 2005). Parâmetros cinemáticos associados a movimentos espermáticos vigorosos tais como VCL, ALH e LIN são modificados durante a transição da motilidade progressiva para hiperativada (Hirano *et al.*, 2001). Nossos resultados indicam que a redução da hiperativação induzida pela SVS2m está associada à redução do VCL, ALH e LIN. Recentemente, estudos demonstraram que SVS2 murina, purificada do fluido seminal, inibiu a motilidade hiperativada *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 2020). Considerando que a reprodução é um evento tempo- dependente, é provável que a SVS2 contribua para que os espermatozoides atinjam sua capacidade total de fertilização no momento apropriado, impedindo a ativação prematura da motilidade e a hiperativação ectópica. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais a SVS2 inibe a motilidade espermática progressiva e hiperativada, ainda precisam ser elucidados.

De forma interessante, estudos demonstraram que a SVS3 murina não alterou a capacitação espermática *in vitro*, porém foi capaz de potencializar os efeitos inibitórios da SVS2 sobre esse processo (Araki *et al.*, 2016). Esses achados indicaram que a SVS2 e a SVS3 podem atuar de forma sinérgica no controle da função espermática. Visando testar a hipótese de que a SVS3 facilita as ações inibitórias da SVS2 sobre a motilidade espermática, investigamos os efeitos da SVS3m, sozinha ou em associação com a SVS2m, sobre a motilidade espermática. Nossos resultados não corroboraram essa hipótese, visto que nas concentrações testadas, a SVS3m não modificou a motilidade espermática, apresentando apenas efeitos inibitórios modestos sobre o VCL e ALH. Essas alterações, entretanto, foram suficientes para afetar negativamente o perfil de hiperativação dos espermatozoides, porém apenas em concentrações intermediárias da SVS3m. Em adição, a co-incubação SVS2m com SVS3m não potencializou os efeitos inibitórios da SVS2m sobre a motilidade espermática.

O efeito facilitador da SVS3 sobre a inibição da capacitação espermática mediada pela SVS2 foi associado ao fato da primeira conter apenas dois domínios de reconhecimento de colesterol (Araki *et al.*, 2016). A SVS2, por sua vez, possui sete domínios de reconhecimento

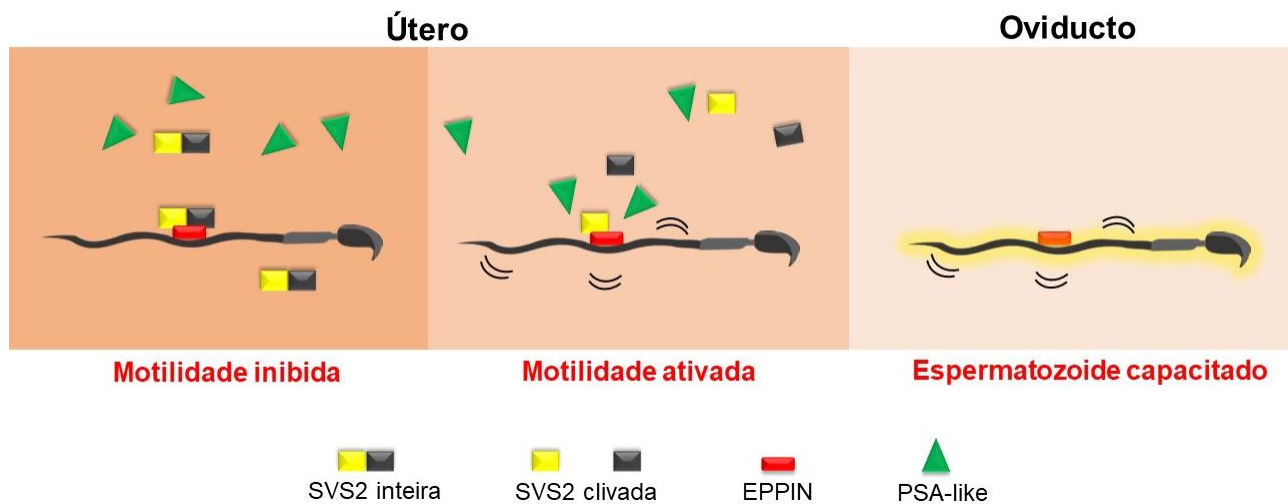
de colesterol em sua sequência primária, sendo mais efetiva na inibição da retirada do colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (Araki *et al.*, 2016). Dessa forma, a interação SVS2:SVS3 gera um complexo proteico com maior efetividade para inibir a remoção do colesterol da membrana plasmática, efeito importante para disparar a capacitação (Araki *et al.*, 2016). Em harmonia com essa hipótese, dados recentes do nosso grupo indicaram que a SVS2 e a SVS3 fazem parte de um complexo proteico na superfície do espermatozoide murino (Mariani *et al.*, 2020). É possível, entretanto, que esse mecanismo não seja relevante para facilitar o controle da motilidade espermática pela SVS2. Vale salientar, entretanto, que a falta de ensaios testando concentrações menores de SVS2m associadas a outras relações molares de SVS3 foi uma limitação desse estudo e deverão ser realizadas para fornecer evidências experimentais mais fortes que possam refutar nossa hipótese inicial.

Em conjunto, nossos resultados fornecem evidências adicionais para a hipótese de que as funções de SVS2 e SEMG1 são conservadas em roedores e primatas, respectivamente. De fato, o efeito inibitório da SEMG1 sobre a motilidade progressiva, bem como parâmetros cinemáticos, como VSL e VCL, de espermatozoides humanos já está bem caracterizado na literatura (Robert & Gagnon, 1995; Robert & Gagnon, 1996; Robert & Gagnon, 1999; Malm *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2008a; Yoshida *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Esse efeito é mediado, pelo menos em parte, pela ligação da SEMG1 à proteína EPPIN, presente na superfície do espermatozoide (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012a; Silva *et al.*, 2013). Nossos resultados apontam que a SVS2 murina desempenha um papel semelhante ao da SEMG1 na inibição transitória da motilidade do espermatozoide murino após a ejaculação. Em sustentação a esta hipótese, dados recentes do nosso grupo demonstraram que a SVS2 é uma proteína parceira da EPPIN no espermatozoide murino (Mariani *et al.*, 2020).

Com base em nossos achados, propomos que o efeito inibitório da SVS2 sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos ocorre via interação com a EPPIN. Dessa forma, propomos o seguinte modelo para explicar o efeito inibitório da SVS2 sobre a função espermática (Figura 19): 1) após a ejaculação a SVS2 se liga ao espermatozoide via EPPIN, suprimindo

sua motilidade progressiva; 2) a clivagem da SVS2 por proteínas semelhantes à PSA resulta na degradação da sequência da SVS2 responsável pela inibição da motilidade, o que garante ao espermatozoide a capacidade de se locomover progressivamente em direção ao oviduto;

3) a sequência da SVS2 responsável pela inibição da capacitação permanece ligada ao espermatozoide, sendo removida apenas no oviduto, permitindo que o espermatozoide capacite e fertilize o oócito. Uma investigação mais aprofundada será necessária para testar a viabilidade desse modelo, abrindo novas perspectivas sobre o estudo das contribuições das proteínas REST's para a (in)fertilidade masculina.



**Figura 19.** Modelo de trabalho demonstrando o efeito inibitório da SVS2 sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos via interação com a EPPIN. Após a ejaculação, SVS2 interage com a EPPIN na superfície espermática levando a inibição da motilidade. Proteínas semelhantes a PSA clivam a sequência da SVS2 responsável pela inibição da motilidade, permitindo que o espermatozoide adquira a motilidade ativada. No oviduto, a sequência da SVS2 responsável pela inibição da capacitação é removida, garantindo que o espermatozoide capacite e fertilize o oócito.

## **6. Conclusão**

## **6. Conclusão**

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

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

## ***7. Referências bibliográficas***

## 7. Referências bibliográficas

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

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

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

Araki, N.; Trencsényi, G.; Krasznai, Z. T.; Nizsalóczy, E. et al. Seminal Vesicle Secretion 2 Acts as a Protectant of Sperm Sterols and Prevents Ectopic Sperm Capacitation in Mice1. **Biol Reprod**, v. 92, n. 1, p. 8, 1-10-8, 1-10, 2015. doi. 10.1095/biolreprod.114.120642.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.1016/j.mce.2006.01.004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lu, S.-H.; Yen, Y.-K.; Ling, T.-Y.; Cheng, K.-T. et al. Capacitation suppression by mouse seminal vesicle autoantigen involves a decrease in plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA)- mediated intracellular calcium. **J Cell Biochem**, v. 111, n. 5, p. 1188-98, 2010. doi. 10.1002/jcb.22844.

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

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

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

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

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

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

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

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

Mendes, F. R.; Hamamura, M.; Queiroz, D. B.; Porto, C. S. et al. Effects of androgen manipulation on  $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in the rat seminal vesicle. **Life Sci**, v. 75, n. 12, p. 1449-63, 2004. doi. 10.1016/j.lfs.2004.03.011.

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

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

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

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

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

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

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

O'Donnell, L.; Meachem, S. J.; Stanton, P. G.; McLachlan, R. I. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: Jimmy, D. N.; Ph.D; Tony, M. P.; Donald, W. P.; John, R. G. C.; D.Sc; F.R.S.C; David, M. d. K.; M.D; A.O; JoAnne, S. R.; Paul M. Wassarman, P. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.1017-69.

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

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

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

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

Peitz, B.; Olds-Clarke, P. Effects of Seminal Vesicle Removal on Fertility and Uterine Sperm Motility in the House Mouse<sup>1</sup>. **Biol Reprod**, v. 35, n. 3, p. 608-17, 1986. doi. 10.1095/biolreprod35.3.608.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: Jimmy, D. N.;Ph.D;Tony, M. P.;Donald, W. P.;John, R. G. C.;D.Sc;F.R.S.C;David, M. d. K.;M.D;A.O;JoAnne, S. R.; Paul M. Wassarman, P. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p.771-825.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Xia, J.; Reigada, D.; Mitchell, C. H.; Ren, D. CATSPER channel-mediated Ca<sup>2+</sup> entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. **Biol Reprod**, v. 77, n. 3, p. 551-9, 2007. doi. [10.1095/biolreprod.107.061358](https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061358).

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

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

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

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

## **8. Anexos**

## Anexo I



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

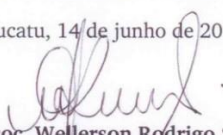


### *Certificado*

Certificamos que o projeto intitulado "Papel das proteínas do plasma seminal SVS2 e SVS3 sobre a motilidade de espermatozoides de camundongos: repercussões para a função espermática e fertilidade", Protocolo nº **1068-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:          | <input type="checkbox"/> Ensino                                                                                                                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência do Projeto: | Início: 5/3/2018                                                                                                                                                                 | Término: 5/3/2020                                       |
| Espécie/linhagem:    | Camundongo <i>Mus musculus</i> C57BL6 e Swiss                                                                                                                                    |                                                         |
| Nº de animais:       | 98 (30 Swiss e 68 C57BL/6)                                                                                                                                                       |                                                         |
| Peso:                | 25-50g                                                                                                                                                                           | Idade: 90-120 dias                                      |
| Sexo:                | Macho                                                                                                                                                                            |                                                         |
| Origem               | Anilab-Animais de Laboratório e Criação Com. Ltda. EPP<br>CNPJ: 65.440.612/0001-40<br>CPPA – Centro de Pesquisa e Prod. de Animais – Unesp-Botucatu. - CNPJ: 458.031.918/0001-24 |                                                         |

Botucatu, 14 de junho 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: secda@ibb.unesp.br

## Anexo II

### Alinhamento das sequências primárias da SVS3A (NP\_067338) e SVS3B (NP\_775553) de camundongos

#### Legenda:

Marcado em **amarelo**: aminoácidos diferentes entre as proteínas.

Colorido em **vermelho/negrito**: epítipo do anticorpo anti-SVS3.

Letras minúsculas: peptídeo sinal.

|                                                         |             |            |             |     |            |            |            |            |            |     |
|---------------------------------------------------------|-------------|------------|-------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <b>SVS3A</b>                                            | mksiffslsl  | llllekkaag | IELYAGG     | TKG | HFLVKTSP   | LM         | FIGK       | NQFLYG     | HKEEQEEAPE | 060 |
| <b>SVS3B</b>                                            | mksiffslsl  | llllekkaag | IELYAGG     | TKG | HFLVKTSP   | LM         | FIGK       | SQFLYG     | HKEEQEEAPE | 060 |
| <b>DADADM GGALSSQE (epítipo do anticorpo anti-SVS3)</b> |             |            |             |     |            |            |            |            |            |     |
| <b>SVS3A</b>                                            | ESIFVQTKHH  | EYGQDADADM | GGALSSQE    | LT  | SLKEDIVCEE | EDELAQQKSQ | LPSQSQIKSQ |            |            | 120 |
| <b>SVS3B</b>                                            | ESIFVQTKHH  | AYGQDADADM | GEALSSQE    | LT  | SLKEDIVCEE | EDELAQQKSQ | LPSQSQIKSQ |            |            | 120 |
| <b>SVS3A</b>                                            | TQVKSIAAQL  | KSQPGQLKTI | GQVKSQTMLK  |     | SHGAPLKS   | FK         | ARLNLREDIP | QQVKGRGYGL |            | 180 |
| <b>SVS3B</b>                                            | TQVKSIAAQL  | KSQPGQLKTI | GQMKSQTMLK  |     | SHGAPLKS   | YK         | ARLNLREDIP | QQVKGRGYGL |            | 180 |
| <b>SVS3A</b>                                            | AEDLAQVRQQ  | PAKVHRLKGK | HRQSRKTAAAF |     | YPQFRRRSRP | YPRYFVQFQE | QLQGSVHHTK |            |            | 240 |
| <b>SVS3B</b>                                            | AEDLAQVRQQ  | PAKVHRLKGK | HRQSRKTAAAF |     | YPQFRRRSRP | YPRYFVQFQE | QLQGSVHHTK |            |            | 240 |
| <b>SVS3A</b>                                            | SFYPPGPGMCY | CPRGGVILYQ | DAFTD       |     |            |            |            |            |            | 265 |
| <b>SVS3B</b>                                            | SFYPPGPGMCY | CPRGGVILYQ | DAFTD       |     |            |            |            |            |            | 265 |

## Anexo III

**Alinhamento dos transcritos Svs3a\_v1 (NM\_021363.2), Svs3a\_v2 (NM\_001311114.1) e Svs3b (NM\_173377.2) de camundongos**

**Legenda:**

Marcado em **amarelo**: nucleotídeos diferentes entre a Svs3a (variantes 1 e 2) e Svs3b;

Colorido em **vermelho/negrito**: junção éxon/éxon para cada transcrito.

Colorido em **azul/negrito**: sequências dos oligonucleotídeos iniciadores senso (F1 e F2)

Colorido em **roxo/negrito**: sequências dos oligonucleotídeos iniciadores antissensos (R1 e R2)

|                |                              |                     |                     |                                                       |            |                     |      |
|----------------|------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------------------------|------------|---------------------|------|
| <b>Svs3av1</b> | - <b>G</b> TG <b>C</b> AGGCC | CTTCCTGGTA          | AGATGAAGTC          | CATCTTCTTC                                            | AGCCTTTCTC | TGCTCCTCCT          | 0059 |
| <b>Svs3av2</b> | <b>A</b> GTG <b>C</b> AGGCC  | CTTCCTGGTA          | AGATGAAGTC          | CATCTTCTTC                                            | AGCCTTTCTC | TGCTCCTCCT          | 0060 |
| <b>Svs3b</b>   | AGT <b>G</b> AAGGCC          | CTTCCTGGTA          | AGATGAAGTC          | CATCTTCTTC                                            | AGCCTTTCTC | TGCTCCTCCT          | 0060 |
| <b>Svs3av1</b> | TCTGGAGAAG                   | AAAGCAGCTG          | GGATAGAACT          | CTAT <b>G</b> CAGGT                                   | GGAACAAAAG | GACACTTCCT          | 0119 |
| <b>Svs3av2</b> | TCTGGAGAAG                   | AAAGCAGCTG          | GGATAGAACT          | CTAT <b>G</b> --- <b>G</b> T                          | GGAACAAAAG | GACACTTCCT          | 0117 |
| <b>Svs3b</b>   | TCTGGAGAAG                   | AAAGCAGCTG          | GGATAGAACT          | CTAT <b>G</b> CAGGT                                   | GGAACAAAAG | GACACTTCCT          | 0120 |
|                |                              |                     |                     | <b>(primer sense Svs3_F2) AGCCAG TTCCTCTATG GGCAC</b> |            |                     |      |
| <b>Svs3av1</b> | AGTAAAAACC                   | T <b>C</b> CCCACTCA | TGTTTATTGG          | GAAAA <b>C</b> CCAG                                   | TTCTCTATG  | GGCACAAAGA          | 0179 |
| <b>Svs3av2</b> | AGTAAAAACC                   | T <b>C</b> CCCACTCA | TGTTTATTGG          | GAAAA <b>C</b> CCAG                                   | TTCTCTATG  | GGCACAAAGA          | 0177 |
| <b>Svs3b</b>   | AGTAAAAACC                   | T <b>C</b> CCCACTCA | TGTTTATTGG          | GAAAA <b>C</b> CCAG                                   | TTCTCTATG  | GGCACAAAGA          | 0180 |
| <b>Svs3av1</b> | AGAACAGGAA                   | GAGGCACCTG          | AAGAAAGCAT          | CTTTGTGCAA                                            | ACTAAGCACC | AT <b>G</b> AATATGG | 0239 |
| <b>Svs3av2</b> | AGAACAGGAA                   | GAGGCACCTG          | AAGAAAGCAT          | CTTTGTGCAA                                            | ACTAAGCACC | AT <b>G</b> AATATGG | 0237 |
| <b>Svs3b</b>   | AGAACAGGAA                   | GAGGCACCTG          | AAGAAAGCAT          | CTTTGTGCAA                                            | ACTAAGCACC | AT <b>G</b> CATATGG | 0240 |
| <b>Svs3av1</b> | CCAGGATGCT                   | GATGCTGACA          | TGGGAGGGGC          | ACTCAGTTCA                                            | CAGGAACTGA | CAAGTTTAAA          | 0299 |
| <b>Svs3av2</b> | CCAGGATGCT                   | GATGCTGACA          | TGGGAGGGGC          | ACTCAGTTCA                                            | CAGGAACTGA | CAAGTTTAAA          | 0297 |
| <b>Svs3b</b>   | CCAGGATGCT                   | GATGCTGACA          | TGGGAGAGGC          | ACTCAGTTCA                                            | CAGGAACTGA | CAAGTTTAAA          | 0300 |
| <b>Svs3av1</b> | GGAAGACATA                   | GTTTGTGAAG          | AAGAAGATGA          | GCTTGCCCAA                                            | CAAAAATCCC | AGCTGCCATC          | 0359 |
| <b>Svs3av2</b> | GGAAGACATA                   | GTTTGTGAAG          | AAGAAGATGA          | GCTTGCCCAA                                            | CAAAAATCCC | AGCTGCCATC          | 0357 |
| <b>Svs3b</b>   | GGAAGACATA                   | GTTTGTGAAG          | AAGAAGATGA          | GCTTGCCCAA                                            | CAAAAATCCC | AGCTGCCATC          | 0360 |
| <b>Svs3av1</b> | CCAGTCACAA                   | ATAAAATCCC          | AAAC <b>T</b> CAAGT | AAAATCCTAC                                            | GCAGCCCAAC | TGAAGTCCCA          | 0419 |
| <b>Svs3av2</b> | CCAGTCACAA                   | ATAAAATCCC          | AAAC <b>T</b> CAAGT | AAAATCCTAC                                            | GCAGCCCAAC | TGAAGTCCCA          | 0417 |
| <b>Svs3b</b>   | CCAGTCACAA                   | ATAAAATCCC          | AAAC <b>C</b> CAAGT | AAAATCCTAC                                            | GCAGCCCAAC | TGAAGTCCCA          | 0420 |
| <b>Svs3av1</b> | ACCAGGCCAG                   | CTAAAGACCA          | TAGGGCAG <b>G</b> T | GAAGTCACAA                                            | ACCATGCTGA | AATCCCACGG          | 0479 |
| <b>Svs3av2</b> | ACCAGGCCAG                   | CTAAAGACCA          | TAGGGCAG <b>G</b> T | GAAGTCACAA                                            | ACCATGCTGA | AATCCCACGG          | 0477 |
| <b>Svs3b</b>   | ACCAGGCCAG                   | CTAAAGACCA          | TAGGGCAG <b>T</b>   | GAAGTCACAA                                            | ACCATGCTGA | AATCCCACGG          | 0480 |
| <b>Svs3av1</b> | AGCCCCCTCTG                  | AAGTCCT <b>T</b> CA | AAGCACGCCT          | TAATCTGCGA                                            | GAAGACATTC | CTCAGCAAGT          | 0539 |
| <b>Svs3av2</b> | AGCCCCCTCTG                  | AAGTCCT <b>T</b> CA | AAGCACGCCT          | TAATCTGCGA                                            | GAAGACATTC | CTCAGCAAGT          | 0537 |
| <b>Svs3b</b>   | AGCCCCCTCTG                  | AAGTCCT <b>T</b> CA | AAGCACGCCT          | TAATCTGCGA                                            | GAAGACATTC | CTCAGCAAGT          | 0540 |
| <b>Svs3av1</b> | CAAGGGCAGA                   | GGATATGGCC          | TGGCTGAAGA          | CCTGGCCCAA                                            | GTGCGTCAAC | AGCCAGCAAA          | 0599 |
| <b>Svs3av2</b> | CAAGGGCAGA                   | GGATATGGCC          | TGGCTGAAGA          | CCTGGCCCAA                                            | GTGCGTCAAC | AGCCAGCAAA          | 0597 |
| <b>Svs3b</b>   | CAAGGGCAGA                   | GGATATGGCC          | TGGCTGAAGA          | CCTGGCCCAA                                            | GTGCGTCAAC | AGCCAGCAAA          | 0600 |
| <b>Svs3av1</b> | GGTTCACAGG                   | CTCAAAGGAA          | AGCACAGGCA          | GTCCAGGAAA                                            | ACAGCAGCAT | TCTACCCACA          | 0659 |
| <b>Svs3av2</b> | GGTTCACAGG                   | CTCAAAGGAA          | AGCACAGGCA          | GTCCAGGAAA                                            | ACAGCAGCAT | TCTACCCACA          | 0657 |
| <b>Svs3b</b>   | GGTTCACAGG                   | CTCAAAGGAA          | AGCACAGGCA          | GTCCAGGAAA                                            | ACAGCAGCAT | TCTACCCACA          | 0660 |
| <b>Svs3av1</b> | GTTTCAGACGC                  | CGCTCTCGGC          | CCTACCCTCG          | GTACTTTGTG                                            | CAATTTCAAG | AGCAGCTACA          | 0719 |
| <b>Svs3av2</b> | GTTTCAGACGC                  | CGCTCTCGGC          | CCTACCCTCG          | GTACTTTGTG                                            | CAATTTCAAG | AGCAGCTACA          | 0717 |
| <b>Svs3b</b>   | GTTTCAGACGC                  | CGCTCTCGGC          | CCTACCCTCG          | GTACTTTGTG                                            | CAATTTCAAG | AGCAGCTACA          | 0720 |
| <b>Svs3av1</b> | GGGCAGTGTT                   | CATCACACAA          | AATCTTTCTA          | CCCAGGTCCT                                            | GGGATGTGCT | ACTGTCCAAG          | 0779 |
| <b>Svs3av2</b> | GGGCAGTGTT                   | CATCACACAA          | AATCTTTCTA          | CCCAGGTCCT                                            | GGGATGTGCT | ACTGTCCAAG          | 0777 |
| <b>Svs3b</b>   | GGGCAGTGTT                   | CATCACACAA          | AATCTTTCTA          | CCCAGGTCCT                                            | GGGATGTGCT | ACTGTCCAAG          | 0780 |

**Svs3av1** AGGAGGGGTG ATTCTATACC AAGATGCCTT CACTGATTAA GGCATTCATT AACCTCTCAA 0839  
**Svs3av2** AGGAGGGGTG ATTCTATACC AAGATGCCTT CACTGATTAA GGCATTCATT AACCTCTCAA 0837  
**Svs3b** AGGAGGGGTG ATTCTATACC AAGATGCCTT CACTGATTAA GGCATTCATT AACCTCTCAA 0840  
                   **C ACATTTAGAG GAGTCACCAG (primer sense Svs3\_F1)**  
                                   **TCTC CTCAGTGGTC TGAACAC (primer antisense Svs3\_R2)**  
**Svs3av1** GAATTAAGAC ACATTTAGAG GAGTCACCTG ACCTGTGTGG ACTGTGATGT CCTGAAGATG 0899  
**Svs3av2** GAATTAAGAC ACATTTAGAG GAGTCACCTG ACCTGTGTGG ACTGTGATGT CCTGAAGATG 0897  
**Svs3b** GAATTAAGAC ACATTTAGAG GAGTCACCAG ACTTGTGTGG ACTGTGATGT CCTGAAGATG 0900

**Svs3av1** CTGACCACTC TCTAGTCCTC AACACCTTGC ACGGATGCCA TGACCCACTC ACACATTCTT 0959  
**Svs3av2** CTGACCACTC TCTAGTCCTC AACACCTTGC ACGGATGCCA TGACCCACTC ACACATTCTT 0957  
**Svs3b** TTGACCACCC TGTAGTCCTT AACACCTTGC ACGGATGCCA TCACCCACTC ACACATTCTT 0960  
                                                                                   **CGGA**

**Svs3av1** TCCTGAGACT TTCTAATGTT GGAGCAACCT CACACAGGTG CTCTCTAATA AGCAGAGCCT 1019  
**Svs3av2** TCCTGAGACT TTCTAATGTT GGAGCAACCT CACACAGGTG CTCTCTAATA AGCAGAGCCT 1017  
**Svs3b** TCCTGAGACT TTCTAATGTT GCAGCAACCT CACACAGGTG CTCTCTAATA AACAGAGCCT 1020  
                   **AGAAGTGTAG TCAACG (primer antisense Svs3\_R1)**

**Svs3av1** TGCTGACATC ATTTGCTTTT GACTGTTGAA -ATCTCCAAG TTCCTAGTGG TTTTCGGTGTCT 1078  
**Svs3av2** TGCTGACATC ATTTGCTTTT GACTGTTGAA -ATCTCCAAG TTCCTAGTGG TTTTCGGTGTCT 1076  
**Svs3b** TCTTGACATC AGTTGCTTTA AAAAAAAAAA CATGTCCTTTT TTTTCAATTG AAATAGAA-T 1079

**Svs3av1** TGGGTGGCAC ATTTTCAAAT GATCAACTCA CACTGAAACA TCCGTACACT CTTGTAGTGT 1138  
**Svs3av2** TGGGTGGCAC ATTTTCAAAT GATCAACTCA CACTGAAACA TCCGTACACT CTTGTAGTGT 1136  
**Svs3b** TACATTACTT TCCCCTGGTC TTTTCTCTCT CAACCTGTCT CCCTTACACT TTTCCATCTT 1139

**Svs3av1** TACACATACT AGAAAACAAG TGTTTCCCAA TAAAGATATT GCTTTGGCAT CAATTGCTTT  
**Svs3av2** TACACATACT AGAAAACAAG TGTTTCCCAA TAAAGATATT GCTTTGGCAT CAATTGCTTT 1198  
**Svs3b** CTCTCATGCC CTGCCACTGT CAAGTTCATA TCATCTTTGT CTTTGTAGTAT TGTTTTAAAA 1196  
                                                                                   1199

**Svs3av1** T----- 1200  
**Svs3av2** T----- 1198

**Svs3b** TACGTATATA TGTATGTGCA TTCACAAATA TATAAATACA ACTTGCTGAG TCT 1252