

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/09/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Alan Andrew dos Santos Silva

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

**Botucatu-SP
2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Alan Andrew dos Santos Silva

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

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

Candidato: Alan Andrew dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

**Botucatu-SP
202**

S586p

Silva, Alan Andrew dos Santos

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

112 p. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Prof. Dr. Erick Jose Ramo Silva

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Auxílio Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

ACs/ADCY10: adenilil ciclase solúvel

AMPC: adenosina 3'-5'- monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

BRDT: proteína bromodomínio específica do testículo

BSA: albumina de soro bovina

CA: anidrase carbonica

CatSper: canal de cátions dos espermatozoides

CFTR: regulador de condutância de membrana na fibrose cística

CRISP: proteína secretada rica em cisteínas

DHT: di-hidrotestosterona

DMA: dimetandrolona

DMAU: undecanoato de dimetandrolona

DPBS: solução salina tamponada com fosfato (Dulbecco)

DTT: ditionitreitol

EPPIN: inibidor de protease epididimário

ET: enantato de testosterona

FDE: fosfodiesterase

FSH: hormônio folículo estimulante

GAPDS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase espermática

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

GSK3: glicogênio sintase quinase 3

HBSS: Solução Balanceada de HANK'S

HHG: hipotálamo-hipófise-gonadal

Hv1: canal de hidrogênio dependente de voltagem

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IgG: imunoglobulina G

IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato

LH: hormônio luteinizante

NBC: cotransportador de sódio e bicarbonato

NES: nestorona

PBS: tampão fosfato-salino

PKA: proteína quinase A

PPP1: fosfoproteína fosfatase 1

PSA: antígeno prostático específico

SACH: isômero (S) α -cloridrina

SEMG1: semenogelina 1

SLC: cotransportador de cloro e bicarbonato

SLC: transportador carregador de soluto

sNHE: trocador de Na^+/H^+

SVS2: seminal vesicle secretory protein 2, do inglês

TCEP: tris(2-carboxietil) fosfina

TRPV4: canal de voltagem regulado por temperatura

UT: undecanoato de testosterona

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

ZP3: zona pellucida glycoprotein 3, do inglês

SUMÁRIO

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

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

Capítulo 1

1. Introdução

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

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

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

1.1 Estratégias hormonais para contracepção masculina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Estratégias não-hormonais para contracepção masculina

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

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

Capítulo 4

CONCLUSÃO

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

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

Referências bibliográficas dos capítulos 1 e 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FLORMAN, H. M.; DUCIBELLA, T. CHAPTER 2 - Fertilization in Mammals. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. St Louis: Academic Press, 2006. p. 55–112.

FREITAS, M. J.; VIJAYARAGHAVAN, S.; FARDILHA, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 2–12, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E.; BEYLER, S.; RICHARDSON, R. T. Inhibition of Human Sperm Motility by Contraceptive Anti-Eppin Antibodies from Infertile Male Monkeys: Effect on Cyclic Adenosine Monophosphate. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 279–285, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G.; O'RAND, M. G. Interacting proteins on human spermatozoa: adaptive evolution of the binding of semenogelin I to EPPIN. **PloS One**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e82014, 2013.

SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G.; RICHARDSON, R. T.; O'RAND, M. G. Characterization of EPPIN's semenogelin I binding site: a contraceptive drug target. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 56, 2012. a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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